

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003年7月31日 (31.07.2003)

PCT

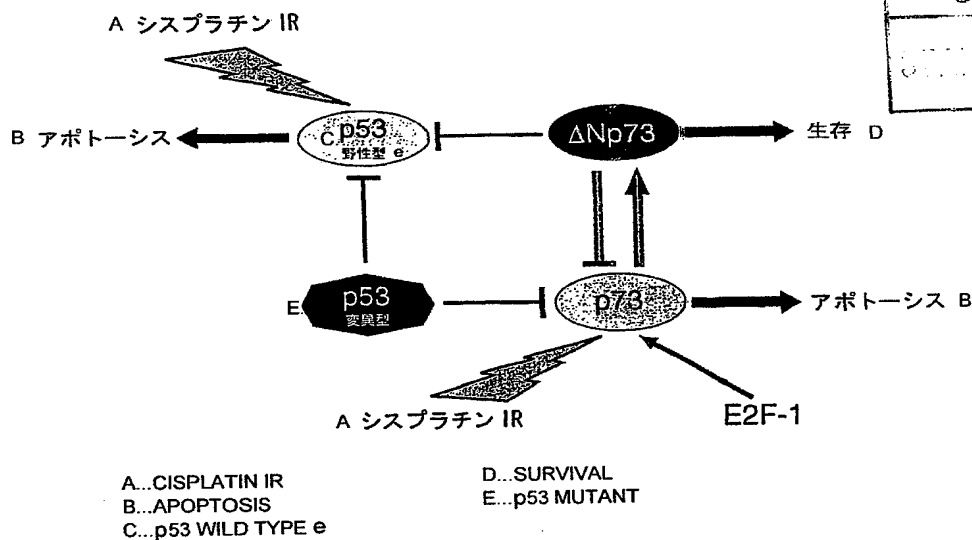
(10) 国際公開番号
WO 03/061710 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 48/00, 38/17, 45/00, A61P 35/00, 43/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/00605
- (22) 国際出願日: 2003年1月23日 (23.01.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2002-17486 2002年1月25日 (25.01.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 久光製薬株式会社 (HISAMITSU PHARMACEUTICAL CO., INC.) [JP/JP]; 〒841-0017 佐賀県 鳥栖市 田代大官町 408 Saga (JP). 千葉県 (CHIBA-PREFECTURE) [JP/JP]; 〒260-8667 千葉県 千葉市中央区 市場町1番1号 Chiba (JP).
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中川原 章 (NAK-AGAWARA, Akira) [JP/JP]; 〒260-0801 千葉県 千葉市中央区 仁戸名町 666-2 千葉県がんセンター内 Chiba (JP).
- (74) 代理人: 長谷川 芳樹, 外 (HASEGAWA, Yoshiki et al.); 〒104-0061 東京都 中央区 銀座一丁目 10番6号 銀座ファーストビル 創英国際特許法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,

[続葉有]

(54) Title: AGENT CONTROLLING THE APOPTOSIS INDUCTION BY p73

(54) 発明の名称: p73のアポトーシス誘導調節剤



(57) Abstract: It is intended to disclose an agent controlling the apoptosis induction by p73 or p53 by clarifying the interaction between p73 and ΔNp73 at the gene and protein levels, a method of enhancing apoptosis of tumor cells with the use of the controlling agent, a p53 and p73 transcription controlling agent comprising a p73 gene and a ΔNp73 gene, nucleic acid medicinal compositions containing a gene-therapeutic composition serving as the above controlling agent, a method of screening the controlling agent, etc. In tumor cells, the apoptosis inducing activity of p73 is regulated by forming a heterooligomer with the use of a substance (for example, a nucleic acid containing a base sequence hybridizable with the base sequence represented by SEQ ID NO:1) which p73-antagonistically binds to a ΔNp73 promoter and thus regulating the promoter activity. Thus, the apoptosis of the tumor cells can be enhanced.

[続葉有]

WO 03/061710 A1



AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受領の際には再公開される。

(57) 要約:

p 7 3 と Δ N p 7 3 との相互作用を遺伝子、蛋白レベルで解明し、p 7 3 または p 5 3 のアポトーシス誘導調節剤、該調節剤を用いて腫瘍細胞のアポトーシスを増大させる方法、p 7 3 遺伝子および Δ N p 7 3 遺伝子からなる p 5 3 および p 7 3 の転写活性調節剤、前記調節剤として作用する遺伝子治療用組成物を含む核酸医薬組成物、および該調節剤のスクリーニング方法等が開示される。

腫瘍細胞において、Δ N p 7 3 プロモーターに p 7 3 と拮抗的に結合する物質 (例えば、配列番号 1 に記載の塩基配列にハイブリダイズする塩基配列を含む核酸) によってヘテロオリゴマーを形成させて、該プロモーター活性を制御することにより、p 7 3 のアポトーシス誘導活性を調節して、該腫瘍細胞のアポトーシスを増大させることができる。

明細書

p 7 3 のアポトーシス誘導調節剤

技術分野

本発明は、腫瘍細胞のアポトーシス調節剤、特に p 7 3 または p 5 3 のアポト
5 ーシス誘導調節剤、およびアポトーシス調節剤のスクリーニング方法に関する。

背景技術

p 7 3 遺伝子は腫瘍サプレッサーである p 5 3 遺伝子と高い相同性を有する遺
伝子として報告された (Kaghad ら)。しかし、p 5 3 と異なり p 7 3 は、多重のス
プライシング形として発現される。それら p 7 3 α と p 7 3 β には共に p 5 3 に
10 存在する転写活性調節ドメイン、DNA 結合ドメイン、複合体形成ドメイン
(Kaghad ら、De Laurenzi ら、De laurenzi および Catani ら) が保存されている。
p 7 3 遺伝子を過剰発現させることにより、例えば p 5 3 により誘導される遺伝
子、p 2 1 遺伝子の発現誘導が観察された。また、p 7 3 は p 5 3 と同様に転写
調節因子として、腫瘍細胞の増殖抑制を示した (Kaghad ら、Jost ら)。p 7 3 と p
15 5 3 とは両者ともに配列特異的なトランス活性化機能を有すると考えられ、それ
ぞれの標的遺伝子のプロモーター領域内の p 5 3 応答配列を認識し、結合すると
されてきたが、正確なメカニズムは、よく理解されていないままであった。

p 7 3 遺伝子は、ヒトの各種癌でヘテロ接合性の欠失頻度の高い染色体 1 p 3
6. 2-3 領域に位置し、その産物は細胞周期の停止やアポトーシスを誘導する
20 ので、p 5 3 と同様に腫瘍サプレッサーと考えられていた (Kaghad ら、Schwab ら)。
しかしながら、p 7 3 遺伝子は、p 5 3 遺伝子に見られるような高頻度の変異を
示さないことや (Ikawa ら)、その他諸々の証左から p 7 3 の機能は p 5 3 の機能
とは異なるメカニズムにより調節されると考えられている (Lissy ら、Marin ら、
Higashino ら、Steegenga ら、Haupt ら、Zeng ら)。

ところで、乳癌、卵巣癌を含むヒト新生物で正常細胞に比べて、高レベルの p
25 7 3 が発現する (Zaika ら、Chen ら)。さらに、E 2 F-1、c-myc や E 1 A

等の細胞性またはウィルス性癌遺伝子産物の過剰発現は、p 7 3 の発現を誘導することが報告されてきた (Lissy ら、Irwin ら、Stiewe ら、Zaika ら)。したがって、p 7 3 は、腫瘍サプレッサーなのか、または癌遺伝子なのか疑問視もされてきた。

p 7 3 蛋白には、N-末端のトランス活性化ドメインを欠く $\Delta N p 7 3$ を含めて、いくつかの変異体が存在する。最近、Pozniak らは、 $\Delta N p 7 3$ がマウス・交感神経細胞で p 5 3 のアポトーシス誘導活性をブロックすることによって、アポトーシスを阻害することを見出した (Pozniak ら)。これらの知見から、 $\Delta N p 7 3$ は、p 7 3 と同様に細胞のアポトーシスに関わる重要な調節因子であることが示唆されてきた。

上記のように、腫瘍サプレッサーとされる p 7 3 の機能は、複雑なメカニズムによって調節され、それに $\Delta N p 7 3$ の関与が疑われるが、今までよくは理解されていなかった。p 7 3 蛋白のアポトーシス誘導活性をそのメカニズムを含めて明らかにし、それを増強する薬剤を見出すことは、新たな抗腫瘍剤の開発につながる。

発明の開示

本発明は、p 7 3 と $\Delta N p 7 3$ との相互作用を遺伝子、蛋白レベルで解明することを課題の 1 つとした。さらに、本発明は、p 7 3 または p 5 3 のアポトーシス誘導調節剤、該調節剤を用いて腫瘍細胞のアポトーシスを増大させる方法、および該調節剤のスクリーニング方法等を提供することを目的とする。

本発明者らは、ヒト神経芽細胞腫細胞 (以下、単に神経芽細胞腫細胞という) をシスプラチンで処理したところ、p 5 3 と p 7 3 が誘導され、加えて $\Delta N p 7 3$ の発現が誘導されることを見出した。さらに、この $\Delta N p 7 3$ のプロモーター領域内に p 7 3 遺伝子が特異的に結合する配列が存在することを見出し、その配列を特定した。 $\Delta N p 7 3$ の過剰発現によって、p 7 3 に誘導されるアポトーシスが阻害されることを見出し、p 7 3 の自己調節因子としての $\Delta N p 7 3$ の機能を明らかにした。 $\Delta N p 7 3$ は、p 7 3 とヘテロオリゴマーを形成し、そのト

ランス活性化とアポトーシス誘導活性を阻害すると考えられる。そこで、p 7 3 と ΔN p 7 3 の細胞内レベルでのバランスによって、腫瘍細胞の p 7 3 誘導性アポトーシスが制御されることになる。このように、p 7 3 と ΔN p 7 3 の相互作用の分子メカニズムを確立することによって、p 7 3 または p 5 3 のアポトーシス誘導調節剤、該調節剤を用いて腫瘍細胞のアポトーシスを増大させる方法、p 7 3 遺伝子および ΔN p 7 3 遺伝子からなる p 5 3 および p 7 3 の転写活性調節剤、および前記調節剤のスクリーニング方法等を提供することが本発明によって可能となった。

すなわち、本発明は以下の(1)～(7)に記載されるものに関する。

(1) ΔN p 7 3 とのヘテロオリゴマー形成を利用することよりなる、p 7 3 のアポトーシス誘導調節剤。

(2) ΔN p 7 3 とのヘテロオリゴマー形成を利用することよりなる、p 5 3 のアポトーシス誘導調節剤。

(3) 配列番号 1 に記載の塩基配列を利用することよりなるアポトーシス誘導調節剤。

(4) 配列番号 1 に記載の塩基配列にハイブリダイズする塩基配列を含む核酸からなるアポトーシス誘導調節剤。

(5) p 7 3 遺伝子および ΔN p 7 3 遺伝子からなる p 5 3 および p 7 3 の転写活性調節剤。

(6) 配列番号 1 に記載の塩基配列を有する核酸を使用する、腫瘍細胞におけるアポトーシス調節剤のスクリーニング方法。

(7) (6)に記載のスクリーニング方法によって得ることができる腫瘍細胞のアポトーシス調節剤。

図面の簡単な説明

図 1 は、シスプラチン誘導性の用量依存的 SH-SY5Y 細胞アポトーシスを示すグラフである。

図 2 は、SH-SY5Y 細胞のシスプラチン処理物の免疫ブロット図である。

図 3 は、SH-SY5Y 細胞のシスプラチン処理物からの RNA を半定量的 RT-PCR で解析した結果を示す電気泳動図である。

5 図 4 は、SH-SY5Y 細胞を lacZ (Ad-lacZ)、p53 (Ad-p53)、または HA-p73 α (Ad-p73 α) を発現する組換えアデノウイルスで感染させた産物のウェスタンブロット図である。

図 5 は、SH-SY5Y 細胞を lacZ (Ad-lacZ)、p53 (Ad-p53)、または HA-p73 α (Ad-p73 α) を発現する組換えアデノウイルスで感染させた産物のノーザンブロット図である。

10 図 6 は、SH-SY5Y、SK-N-AS、SK-N-BE 細胞をそれぞれ lacZ (Ad-lacZ)、p53 (Ad-p53)、または HA-p73 α (Ad-p73 α) を発現する組換えアデノウイルスで感染させた産物からの RNA を半定量的 RT-PCR で解析した結果を示す電気泳動図である。

図 7 は、 Δ Np73 プロモーターの発現能をルシフェラーゼ・リポーターアッセイで測定した結果を示すグラフである。

15 図 8 は、 Δ Np73 プロモーター領域の塩基配列を示す。

図 9 は、SAOS-2 細胞を pGL2- Δ Np73P(-100) と各種発現プラスミド (p53、HA-p63 γ 、HA-p73 α 、HA-p73 β) の 1 種と共トランスフェクトさせ、 Δ Np73 プロモーター部分の発現能をルシフェラーゼ・リポーターアッセイで測定した結果を示すグラフである。

20 図 10 は、SAOS-2 細胞を pGL2- Δ Np73P(-76/-57) と各種発現プラスミド (p53、HA-p63 γ 、HA-p73 α 、HA-p73 β) の一種と共トランスフェクトさせ、 Δ Np73 プロモーター部分の発現能をルシフェラーゼ・リポーターアッセイで測定した結果を示すグラフである。

25 図 11 は、電気泳動移動度シフトアッセイによって Δ Np73 プロモーターに対して、p73 と拮抗的に結合する競合 DNA の結合反応を試験した結果を示す電気泳動図である。

図 1 2 は、図 1 1 と同様な電気泳動移動度シフトアッセイの結果を示す電気泳動図である。

図 1 3 は、293 細胞を各種発現プラスミド (HA-p73 α 、HA-p73 β 、FLAG- Δ Np73 α 、および FLAG- Δ Np73 β) の 1 種または 2 種でトランスフェクトした産物の免疫ブロット図である。

図 1 4 は、COS7 細胞を各種発現プラスミド (p53、FLAG- Δ Np73 α 、および FLAG- Δ Np73 β) の 1 種または 2 種でトランスフェクトした産物の免疫ブロット図である。

図 1 5 は、SAOS-2 細胞を各種発現プラスミド (p53、p73 α 、p73 β 、 Δ Np73 α 、および Δ Np73 β) の 1 種または 2 種でトランスフェクトさせ、MDM2 プロモーターの発現能をルシフェラーゼ・リポーターアッセイで測定した結果を示すグラフである。

図 1 6 は、SAOS-2 細胞を各種発現プラスミド (p53、p73 α 、p73 β 、 Δ Np73 α 、および Δ Np73 β) の 1 種または 2 種でトランスフェクトさせ、Bax プロモーターの発現能をルシフェラーゼ・リポーターアッセイで測定した結果を示すグラフである。

図 1 7 は、SAOS-2 細胞を各種発現プラスミド (p53、p73 α 、p73 β 、 Δ Np73 α 、および Δ Np73 β) の 1 種または 2 種でトランスフェクトさせ、 Δ Np73 プロモーターの発現能をルシフェラーゼ・リポーターアッセイで測定した結果を示すグラフである。

図 1 8 は、SK-N-BE 細胞を p73 α (Ad-p73 α) と増加量の Δ Np73 α (Ad- Δ Np73 α) を発現する組換えアデノウイルスで共感染させた結果、細胞アポトーシスの変化を示すグラフである。

図 1 9 は、SK-N-BE 細胞を Δ Np73 α (Ad- Δ Np73 α) を発現する組換えアデノウイルスで感染させ、さらに産物をシスプラチンの可変濃度で処理した結果、シスプラチン誘導性の細胞アポトーシスの変化を示すグラフである。

図20は、本発明の基礎となる腫瘍関連遺伝子の細胞レベルでの相互作用、相関関係を模式的に表示した図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明について好適な実施の形態を参照して、詳細に説明する。

5 本明細書で使用する「核酸」という用語は、例えばDNAまたはRNA、或いはそれらから誘導される活性なDNAまたはRNAであるポリヌクレオチドを指し、好ましくはDNAまたはRNAを意味する。特に好ましい核酸は、本明細書中に開示されるDNA配列を有するか、もしくはそれに相補的な配列を有する。

10 本明細書で使用する「拮抗的に結合する核酸」とは、結合する配列の本来の標的エレメント（核酸またはタンパク質）と競合的に結合する核酸を指し、広い意味では、いわゆるアンチセンス核酸RNAi（RNA干渉分子）類も包含する。

本明細書で使用する「ハイブリダイズ」とは、当業者が理解するように関連する塩基配列を無関係な塩基配列と区別するストリンジェントな条件（Maniatisら、Molecular Cloning—A Laboratory
15 Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 9. 47—9. 62および11. 45—11. 61, 1989を参照）において、核酸間でのハイブリッド形成を指す。すなわち、このようなストリンジェントな条件の例は、（1）洗浄に低イオン強度と高温（例えば50℃で、0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウム、0.1%SDS緩衝液）を使用するか、（2）ハイブリッド
20 形成中にホルムアミドなどの変性剤（例えば42℃で、50%ホルムアミド、0.1%ウシ血清アルブミン、0.1%フィコール、0.1%ポリビニルピロリドン、50mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH6.5）、750mM塩化ナトリウム、75mMクエン酸ナトリウム）を使用するものである。もう一つの例は、42℃で
25 50%ホルムアミド、5×SSC、50mMリン酸ナトリウム（pH6.8）、0.1%ピロリン酸ナトリウム、5×デンハート液、超音波処理したサケ精子DNA

(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、0.1% SDS および 10% デキストラン硫酸を使用し、洗浄を 0.2 \times SSC および 0.1% SDS 中 42 $^{\circ}\text{C}$ で行うものである。当業者は、明瞭で検出可能なハイブリッド形成シグナルを得るのに適したストリンジェントな条件を容易に決定、または変更できる。

5 腫瘍細胞での p 7 3 および $\Delta\text{Np} 7 3$ の発現

本発明者らは、腫瘍細胞を DNA 阻害性の薬剤であるシスプラチンで処理すると、該腫瘍細胞は用量依存的にアポトーシスを起こすことを認めた。その際、p 5 3 と p 7 3 α 蛋白が生成することがウエスタンブロットにより確かめられた。前記腫瘍細胞は、好ましくは神経芽細胞腫細胞であるが、これに限定されず、他の中枢および周辺神経系腫瘍細胞等であってもよい。さらに、前記ウエスタンブロットにおいて、 $\Delta\text{Np} 7 3 \alpha$ 蛋白の生成が示唆され、これは $\Delta\text{Np} 7 3$ 特異的プライマーを用いる、RT-PCR で確認された。すなわち、シスプラチンは、腫瘍細胞で mRNA レベルと蛋白レベルの両方で p 7 3 α と $\Delta\text{Np} 7 3 \alpha$ を誘導する。

10 p 7 3 と $\Delta\text{Np} 7 3$ の関係

また、本発明者らは、腫瘍細胞を用いて、p 5 3 または p 7 3 α のいずれかの遺伝子を発現するアデノウィルスベクターで感染させたところ、p 7 3 α 遺伝子の場合、 $\Delta\text{Np} 7 3 \alpha$ の発現が認められることを見出した。前記発現は、ウエスタンブロットにより、または $\Delta\text{Np} 7 3$ 特異的プローブを用いるノーザンブロットで、或いは上記のように $\Delta\text{Np} 7 3$ 特異的プライマーを用いる RT-PCR で確認された。すなわち、p 7 3 α は $\Delta\text{Np} 7 3 \alpha$ の発現を誘導する。また、p 5 3 は p 7 3 α と異なり $\Delta\text{Np} 7 3 \alpha$ のアップレギュレーションを起こさない。

15 $\Delta\text{Np} 7 3$ 内の p 7 3 特異的配列

さらに、本発明者らは、 $\Delta\text{Np} 7 3$ プロモーター全長 DNA を得て、p 7 3 特異的配列の塩基配列を決定した。該プロモーター領域の連続的な欠失解析は、その塩基配列の位置が -76 ~ -57 位 (配列番号 1) であることを明らかにした。

また、腫瘍細胞を用いる上記と同様の発現試験において、 $\Delta N p 73$ プロモーターのトランス活性化は、予想通り $p 73 \alpha$ (または $p 73 \beta$) によって引き起こされるが、 $p 53$ によっては引き起こされないことが判明した。加えて、競合アッセイ試験の結果から、前記塩基配列領域が $p 73$ との結合に関与しており、 $p 73$ 特異的配列であることが確認された。

$p 73$ と $\Delta N p 73$ との相互作用

また、本発明者らは、腫瘍細胞を用いて $p 73$ (α もしくは β) 遺伝子および $\Delta N p 73$ (α もしくは β) 遺伝子を発現するアデノウィルスベクターで共感染させると、 $\Delta N p 73$ の両イソフォームが $p 73 \alpha$ および $p 73 \beta$ と相互作用することを見出した。さらに、レポーター遺伝子を用いるアッセイから $\Delta N p 73$ の両イソフォームは、 $p 53$ および $p 73$ (α もしくは β) の転写活性を抑制することが明らかにされた。加えて、 $\Delta N p 73$ のプロモーター活性が $p 73$ (α もしくは β) によって抑制されることも明らかにされた。従って、 $p 73$ と $\Delta N p 73$ は、転写活性の調節においてネガティブな自己調節ループを形成している。

$\Delta N p 73$ による $p 73$ アポトーシス誘導調節

さらに、本発明者らは、腫瘍細胞を $p 73 \alpha$ 遺伝子および $\Delta N p 73 \alpha$ 遺伝子を発現するアデノウィルスベクターで共感染させると、該腫瘍細胞のアポトーシスが用量依存的に抑制されることを見出した。加えて、シスプラチン誘導性の腫瘍細胞のアポトーシスが $\Delta N p 73 \alpha$ 遺伝子を発現するアデノウィルスベクターによる感染で抑制されることも見出された。従って、 $p 73 \alpha$ アポトーシス誘導活性は、細胞レベルで $\Delta N p 73 \alpha$ によって調節される。

本発明に係る $p 73$ アポトーシス誘導調節機能を有する $\Delta N p 73$ 遺伝子 (以下、本発明に係る $\Delta N p 73$ 遺伝子という) およびそれによってコードされるタンパク質 (以下、本発明に係る $\Delta N p 73$ タンパク質という)

上記で説明したように、本発明に従えば $p 73$ アポトーシス誘導調節機能を有する $\Delta N p 73$ 遺伝子およびそれによってコードされるタンパク質が提供され

る。この調節機能は、p 7 3 遺伝子上流のプロモーター領域中、本発明により開示された p 7 3 特異的結合可能な塩基配列の支配を受けている。その結合を促進または抑制する結果、これらの遺伝子およびタンパク質は、p 7 3 とこれに拮抗する $\Delta N p 7 3$ の量的バランスを通じて腫瘍細胞のアポトーシスを調節する。

5 また、 $\Delta N p 7 3$ 遺伝子は、p 7 3 蛋白の発現異常症の治療、予防に用いることができる。前記アポトーシス調節に選択されるべき塩基配列としては、前記 $\Delta N p 7 3$ 遺伝子上流、好ましくは $\Delta N p 7 3$ プロモーター領域からなり、さらに好ましくは該領域に p 7 3 特異的結合配列が存在する。特に好ましくは、その塩基配列が配列番号 1 に示されるものである。最も好ましくは、前記特異的結合可能な配列が配列番号 1 に記載の DNA である。該塩基配列を有する DNA は、DNA 自動合成機を使用して、化学合成によって容易に得られる。

10 本発明に係る $\Delta N p 7 3$ 遺伝子を適当なベクター・プロモーターに連結し、宿主細胞に導入して、それがコードするタンパク質を産生させ、抽出、精製することで本発明に係るタンパク質を入手することができる。これらの操作は、当業者には周知である。また、本発明に係る $\Delta N p 7 3$ 遺伝子を適当なウイルス性のベクターに挿入し、これを腫瘍細胞に導入し、適当なプロモーターの転写制御下に本発明に係る $\Delta N p 7 3$ タンパク質を発現させ、腫瘍細胞のアポトーシスの調節効果をあげることもできる。また、発現させる遺伝子は必ずしも $\Delta N p 7 3$ タンパク質をコードしている必要はない。例えば、 $\Delta N p 7 3$ の mRNA に特異的結合可能な塩基配列を含む RNA 転写物（アンチセンスまたは RNAi）を過剰に発現することにより腫瘍細胞のアポトーシスの調節効果を得ることができる。前記腫瘍細胞のアポトーシスの調節効果には、シスプラチン耐性腫瘍細胞のシスプラチン耐性解除する効果が含まれる。前記耐性解除は、非 MDR 型薬剤耐性の獲得を解除する効果を含む。

25 前記適当なベクターとしては、MoMLV ベクター、ヘルパウイルスベクター、アデノウイルスベクター、AAV ベクター、HIV ベクター、SIV ベクター、センダイ

ウイルスベクター等が挙げられるが、これらに限定されない。また、非ウイルス性ベクターも使用可能であり、リポゾーム、リン酸カルシウムと核酸（導入遺伝子）との複合体、カチオン脂質複合体、センダイウイルスリポゾーム、ポリカチオンを主鎖とする高分子キャリアー等が挙げられる。さらに、エレクトロポレーション、遺伝子銃等の方法も細胞への遺伝子導入に使用可能である。

前記ベクターに搭載された遺伝子発現に使用されるプロモーターは、腫瘍細胞等の宿主細胞内で本発明に係る $\Delta N p 7 3$ 遺伝子を発現させることができるものであれば、特に制限されない。例えば、アデノウイルス、サイトメガウイルス、HIV ウイルス、シミアンウイルス 40、ラウス肉腫ウイルス、単純ヘルペスウイルス、マウス白血病ウイルス、シンビスウイルス、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、パピローマウイルス、ヒトT細胞白血病ウイルス、インフルエンザウイルス、日本脳炎ウイルス、JC ウイルス、パルボウイルス B19、ポリオウイルス等のウイルス由来のプロモーター、アルブミン、SR α 、熱ショック蛋白、エロゲーション因子等の哺乳類由来のプロモーター、CAG プロモーター等のキメラ型プロモーター、テトラサイクリン、ステロイド等によって発現が誘導されるプロモーターが挙げられる。また、lac プロモーター等、大腸菌内で発現可能なプロモーターも使用できる。

本発明に係る $\Delta N p 7 3$ タンパク質を単離する必要がある場合、これも当業者に公知の方法で行うことができる。例えば、宿主細胞をホモジナイズする方法、SDS等の界面活性剤や酵素を用いて細胞膜を溶解させる方法、超音波処理、凍結・融解を繰り返す方法等がある。本発明に係る $\Delta N p 7 3$ タンパク質のアミノ酸鎖長が比較的短い場合、上記の遺伝子組替え手法以外に、ペプチド自動合成機を用いた化学合成により製造することも可能である。いずれの方法で得られる本発明に係る $\Delta N p 7 3$ タンパク質も、常法により精製できる。例えば、超遠心や密度勾配遠心、イオン交換カラムやアフィニティーカラム、逆相カラム等を利用したカラム分離、ポリアクリルアミド等を用いたゲル分離等、一般的な生化学的

手法が精製に利用できる。

上記で説明したように、本発明に従えば腫瘍細胞で $\Delta N p 7 3$ プロモーター活性を制御することにより、 $p 7 3$ アポトーシス誘導活性を調節して、該腫瘍細胞のアポトーシスを増大させる方法が提供される。この目的のために、前記 $\Delta N p$
5 $7 3$ プロモーター領域、特に $p 7 3$ 特異的に結合可能な部位（配列番号 1 に記載の塩基配列）に拮抗的に結合し、 $\Delta N p 7 3$ プロモーター活性を制御できる核酸（DNA）を使用する。

このような DNA（以下、本発明に係る DNA という）を腫瘍細胞に導入するには、核酸医薬組成物として、患者に投与することが好ましい。これには、遺伝子治療手法を用いる。すなわち、本発明に係る DNA を治療遺伝子として、遺伝子導入ベクター (gene transfer vector) に挿入し、標的腫瘍細胞までデリバリーする。この目的で用いる適当な組換えベクターは、上記の列举されたベクターの内、哺乳類細胞（特に、ヒト細胞）に遺伝子導入可能なベクターと重複する。同様に使用可能なプロモーターも列举したものの内、哺乳類細胞（特に、ヒト細胞）
10 で遺伝子発現が可能なプロモーターと重複する。治療遺伝子を組み込んだ組換えベクターを水、生理食塩水、等張化した緩衝液等の適当な溶媒に溶解して、目的とする遺伝子治療用組成物が調製できる。

$\Delta N p 7 3$ プロモーター活性を制御するのに、必ずしも本発明に係る DNA を用いる必要はない。リボザイムや RNAi 等も $\Delta N p 7 3$ 遺伝子発現を制御すると考えられるので、使用可能である。これら DNA、RNA、さらにそれによって
20 コードされるタンパク質等は、本発明のアポトーシス調節剤を構成する。

$p 7 3$ 特異的に結合可能な塩基配列を有する核酸を使用した、腫瘍細胞のアポトーシス調節剤のスクリーニング方法

上記で説明したように、本発明に従えば $p 7 3$ 特異的結合可能な塩基配列を有する核酸を使用した、腫瘍細胞のアポトーシス調節剤のスクリーニング方法（以下、本発明のスクリーニング方法という）が提供される。
25

本発明のスクリーニング方法において、対象となる被検物質とは、 $\Delta N p 73$ プロモーターに結合する、或いはその活性を調節するタンパク質またはそれをコードするDNAのみならず、その活性を調節する化合物をも包含する。その化合物は、合成か天然か、低分子か高分子か、有機物か無機物かであるかを問わない。

5 本発明のスクリーニング方法は、当業者には公知である数々の手法によって実施できる。例えば、被検物質が非タンパク質である場合、 $\Delta N p 73$ プロモーターの下流にレポーター遺伝子（例えば、ルシフェラーゼ遺伝子）を連結したベクターを有する細胞（酵母または動物細胞等）と該被検物質を接触させ、レポーター活性を調節するか否かを判定する。レポーター活性を基に $\Delta N p 73$ プロモーター活性を制御（特に、抑制する）する候補化合物を選択する。

10 被検物質として、遺伝子ライブラリーから選択する場合、 $\Delta N p 73$ プロモーターの下流にレポーター遺伝子（例えば、ルシフェラーゼ遺伝子）を連結したベクターを有する細胞にさらに遺伝子ライブラリーDNAを導入して、レポーター遺伝子の発現を誘導または、好ましくは抑制するクローンを選択する。そのクロー

15 ーンに含まれるDNAをシーケンスし、それがコードするタンパク質を同定する。

20 また、 $\Delta N p 73$ プロモーターDNAをビオチン化し、これをストレプトアビジンを結合させたビーズ等に吸着させる。これと細胞の核抽出液をインキュベートして、前記DNAに特異的に結合するタンパク質をアフィニティ精製により選択する。さらに、 $\Delta N p 73$ プロモーターDNAを標識し、これと細胞の核抽出液をインキュベートした後に、電気泳動移動度シフトアッセイ（ゲルシフトアッセイともいう）を行う。ポリアクリロアミドゲル電気泳動後、タンパク質の結合が見られた場合には、DNA／タンパク質複合体のバンドがDNAのみのバンドに対してシフトしており、これをゲルから切り出しタンパク質を抽出する。かく

25 して、前記DNAに特異的に結合するタンパク質を選択することができる。

さらに、遺伝子ライブラリーを導入した大腸菌にタンパク質を発現させ、これ

をフィルターに転写する。ΔNp73プロモーターDNAを標識したプローブとして用い、このフィルターにプロットする。前記プローブと結合するタンパク質を発現するクローンを選択する。そのクローンに含まれるDNAをシーケンスし、それがコードするタンパク質を同定する。

5 上記のスクリーニング方法で同定された腫瘍細胞のアポトーシス調節剤であるタンパク質は、腫瘍を有する患者（または温血動物）に経口的に、または非経口的に投与することにより、間接的に該アポトーシス調節剤を腫瘍細胞に作用させることができる。この目的で、アポトーシス調節剤を薬学的組成物として調製する。これは、有効量の該アポトーシス調節剤を薬学的に許容される担体、もしくは
10 希釈剤と混合して、適当な剤形とする。投与に適した剤形は、錠剤、丸剤、散剤、液剤、懸濁剤、乳剤、カプセル剤、坐剤、注射剤等である。

本発明のアポトーシス調節剤は、ヒトを含む温血動物の各種腫瘍に対して、適用可能であり、例えば神経芽細胞腫がその典型である。

(実施例)

15 以下、実施例を挙げて、本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

(細胞の培養およびトランスフェクション、もしくは感染)

ヒト神経芽細胞腫細胞 (SH-SY5Y 株、SK-N-AS 株、および SK-N-BE 株) を 50 μg/ml カナマイシンと 10% (v/v) 熱不活性化したウシ胎児血清を含む RPMI-1640 培地で培養した。ヒト骨肉種 SAOS-2 細胞、腎胚細胞 293 細胞、および COS7 細胞を 10% (v/v) 熱不活性化したウシ胎児血清と抗生物質を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) で培養した。培養物を 5% CO₂ を含む湿潤大気中、37°C で維持した。SAOS-2 細胞を製造業者のプロトコルに従い、LipofectAMINE (GIBCO/BRL) でトランスフェクトした。293 および COS7 細胞を FuGENE 6 (Roche Molecular Biochemicals) で
20 トランスフェクトした。
25 トランスフェクトした。

(RNA の単離と RT-PCR 解析)

製造業者のプロトコルに従い、Trizol 試薬(GIBCO/BRL)または RNeasy Mini Kit (QIAGEN)を使用して、トータル RNA を調製した。ランダムプライマーと Moloney murine leukemia virus-reverse transcriptase(SuperScript H, GIBCO/BRL)を含む 20 μ l cDNA 合成反応液中、42°Cで1時間、続いて70°C、15 分間の変性、さらに急冷によって、cDNA をテンプレートとして調製した。100 μ l の各 dNTP、1x PCR バッファー、10 μ M の各プライマー、および 0.2 単位の rTaq または LA-Taq DNA ポリメラーゼ(TAKARA)を含む 20 μ l PCR 反応液中、cDNA を増幅した。PCR プライマーは、HA-p 73 に対して、5'-TGGCTTACCCATACGATGTTC-3' (センス鎖) (配列番号 2) と 5'-GTGCTGGACTGCTGGAAAGT-3' (アンチセンス鎖) (配列番号 3); p73 に対して、5'-TCTGGAACCAGACAGCACCT-3' (センス鎖) (配列番号 4) と 5'-GTGCTGGACTGCTGGAAAGT-3' (アンチセンス鎖) (配列番号 5); Δ Np 73 に対して、5'-CGCCTACCATGCTGTACGTC-3' (センス鎖) (配列番号 6) と 5'-GTGCTGGACTGCTGGAAAGT-3' (アンチセンス鎖) (配列番号 7); GAPDH に対して、5'-ACCTGACCTGCCGTCTAGAA-3' (センス鎖) (配列番号 8) と 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' (アンチセンス鎖) (配列番号 9)であった。

(プラスミドおよびアデノウイルス媒介遺伝子導入)

ヘマトグルチニン(HA)-タグされた p73 α または p73 β をコードする哺乳動物発現プラスミドは、M. Kaghad から寄贈された。また、HA-p63 γ の発現プラスミドは S. Ikawa から寄贈された。 Δ Np73 の NH₂ 末端領域をコードする 494-bp の cDNA を SH-SY5Y 細胞に由来するトータル RNA を用いて、RT-PCR により増幅した。前記細胞は、Ad-p73 α によって感染させた。使用したプライマーは、5'-GGATTCAGCCAGTTGACAGAACTA-3' (センス鎖) (配列番号 10) および 5'-GTGCTGGACTGCTGGAAAGT-3' (アンチセンス鎖) (配列番号 11)であった。そのセンスオリゴヌクレオチドプライマーは、ヒト Δ Np73 ゲノム配列とマウス Δ Np73 cDNA (受け入れ番号 Y19235) とに共通して見出される同様の配列に基づいて設計された。増幅した産物を pGEM-T Easy vector (Promega) にサブクローンして、

pGEM- Δ Np73 を得た。この構築体のアイデンティティは、DNA シークエンスで確認した。pGEM- Δ Np73 を部分的に NanrI で消化し、平滑末端化して、NanrI でさらに完全に消化し。NH₂ 末端領域の制限酵素消化断片を pcDNA3-HA-p73 α または pcDNA3-HA-p73 β の酵素的に修飾した KpnI-NanrI 部位にサブクローンして、それぞれ pcDNA3- Δ Np73 α および pcDNA3- Δ Np73 β を得た。アデノウイルス発現ベクターの構築のためには、pcDNA3-p53、pcDNA3-HA-p73 α 、pcDNA3-HA-p73 β 、または pcDNA3- Δ Np73 α に由来する HindIII-XbaI 制限酵素消化断片をクレノウフラグメントで補填して、シャトルベクター pHCMV6 (Ozaki ら) の酵素的に修飾した NotI 部位に挿入した。各シャトルベクターを I-CeuI および PI-SceI で消化して、アデノウイルス発現ベクター pAdHM4 の同一の制限酵素部位に連結した。これらの組換えアデノウイルス構築体の各々を PacI で消化し、293 細胞にトランスフェクトして、組換えアデノウイルス体を生成させた。

(免疫分析)

1 mM フェニルメチルスルホニルフロリドを含む EBC バッファー (50 mM Tris-HCl pH 8.0/120 mM NaCl/0.5% Nonidet P-40) 中で、細胞を溶解させた。その溶解物を 4°C、15 分間、14,000rpm で遠心分離して、清澄化した。タンパク質濃度は、Bradford の手順で決定した。免疫プロット分析のために、タンパク質を SDS ポリアミドゲル電気泳動して、分離しニトロセルロース膜にトランスファーした。その膜フィルターを TBST (10 mM Tris-HCl pH 8.0/150 mM NaCl/0.1% Tween 20) 中の 5% 粉末ミルクで 1 時間、室温でブロックした。その後、モノクローナル抗 HA (12CA5, Roche Molecular Biochemicals) 抗体、モノクローナル抗 p73 α (Ab-1, Oncogene Research Products) 抗体、またはモノクローナル抗 p53 (DO-1, Oncogene Research Products) 抗体と 1 時間、室温でインキュベートした。膜フィルターをホースラディッシュペルオキシダーゼにコンジュゲートされたヤギ抗マウス二次抗体と 1 時間、室温でインキュベートした。結合した二次抗体を製造者のプロトコルに従って、増強された化学発光 (ECL, Amersham Pharmacia Biotech) によって検出した。

(免疫沈降法)

293 細胞または COS7 細胞を上記の発現プラスミド 2 μ g でトランスフェクトした。トランスフェクションの 48 時間後、細胞を EBC バッファー 400 μ l 中で細胞溶解し、短時間超音波処理し、4°C、15 分間、14,000rpm で遠心分離して、細胞残滓を取り除いた。清澄化の後で、全細胞溶解物 400 μ g をポリクローナル抗 HA (Medical and Biological Laboratories) 抗体、またはポリクローナル抗 p53 (DO-1 および PAb1801, Oncogene Research Products) 抗体の混合物とインキュベートすることによって、免疫沈降を実施した。免疫複合体をプロテイン A またはプロテイン G セファローズ・ビーズと沈殿させた。その免疫沈降物を EBC バッ

5

10

ファーで 3 回洗浄した。

(Δ Np73 プロモーター領域のクローニング)

Δ Np73 エキソン 3' を含む Δ Np73 プロモーター領域を PAC クローン (dJ363H11) とプライマー 5'-CCAGGGAGGATCTGTAGCTG-3' (センス鎖) (配列番号 12) および 5'-TGAACCCTACACTGCAGCAA-3' (アンチセンス鎖) (配列番号 13) を用いて、RT-PCR

15

により増幅した。増幅した PCR 産物 (2.9 Kb) を pGEM-T Easy vector (Promega) に直接クローニングして、pGEM- Δ Np73 を得た。この構築物の配列は、DNA シークエンスで確認した。一連の 5'-欠失構築体を生成させるために、その 2.9 Kb 断片を pGL2-ベーシックルシフェラーゼ・レポーター (Promega) の酵素的に修飾した XhoI 位にサブクローニングして、pGL2- Δ Np73PF を得た。pGL2- Δ Np73PF を SmaI、NcoI、

20

または StuI で消化し、平滑末端化し、自己連結させて、pGL2- Δ Np73P (-1082)、pGL2- Δ Np73P (-911)、または pGL2- Δ Np73P (-63) をそれぞれ生成させた。さらに、pGL2- Δ Np73PF を部分的に ApaI で消化し、制限酵素消化断片の各々を回収して、平滑末端化し、自己連結させて、pGL2- Δ Np73PF (-1245)、pGL2- Δ Np73PF (-786)、pGL2- Δ Np73P (-619)、および pGL2- Δ Np73P (-203) を生成させた。 Δ Np73P (-184)、

25

Δ Np73P (-100)、 Δ Np73P (-80)、 Δ Np73P (-76)、 Δ Np73P (-71)、 Δ Np73P (-66)、または Δ Np73P (+1) を生成させるために、pGEM- Δ Np73P をテンプレートとして用

い、対応する領域を PCR で増幅した。得られた PCR 産物を pGL2-ベーシックルシフェラーゼ・レポーターの SmaI 位にサブクローニングして、これらの構築体の塩基配列をシークエンスで確認した。

(電気泳動移動度シフトアッセイ)

- 5 製造者の指示書に従い、TNT Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega) を用いて、p73 α 、p73 β 、または p53 をインビトロで生成させた。電気泳動移動度シフトアッセイは、以前に報告されたように (Ozaki ら) 実施した。簡単には、2 本鎖オリゴヌクレオチドを T4 ポリヌクレオチドキナーゼを用いて、³²P 標識した。網状赤血球溶解液 4 μ l、12.5 mM Tris-HCl (pH7.5)、50 mM KCl、3.125 mM MgCl₂、0.25 mM EDTA、0.5 mM DTT、5%グリセロール、100 μ g/ml ポリ (dI-dC) を含む反応液中、室温で DNA タンパク質結合を実施した。その反応混合物を 1xTris-ホウ酸塩-EDTA バッファー中、5%ポリアクリルアミドゲル上、室温で分離した。

(ルシフェラーゼ・レポーターアッセイ)

- 15 ルシフェラーゼ・レポーターアッセイのために、SAOS-2 細胞 (p53 のホモ接合欠失) をトランスフェクションの 24 時間前に 12 ウエルプレート (5x10⁴ 細胞/ウエル) に 3 重に接種した。ΔNp73 α または ΔNp73 β の存在、或いは不在下、200 ng のレポータープラスミド、20 ng の pRL-TK をコードする Renilla ルシフェラーゼ cDNA、200 ng の発現プラスミド (p53、p73 α または p73 β) で細胞を共トランスフェクトさせた。トランスフェクトされた DNA の全量を pcDNA3 (Invitrogen) で一定量に保った。トランスフェクションの 48 時間後、ルシフェラーゼ活性を二重ルシフェラーゼ・レポーターアッセイシステム (Promega) によって測定した。トランスフェクション率を Renilla ルシフェラーゼ活性に対して標準化した。

(MTT 生存アッセイ)

- 25 ウイルス感染の 24 時間前に、SH-SY5Y および SK-N-BE 細胞を 96 ウエルプレート (5x10³、2x10⁴ 細胞/ウエルでそれぞれ) に接種した。それら細胞を Ad-lacZ また

はAd-p73 α を用いて、所定のMOIで、所定時間、感染させた。細胞生存率をMTTアッセイによって測定した。ここで、(2-(2-メトキシ-4-ニトロフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルホフェニル)-2H-テトラゾリウムモノナトリウム塩を基質として使用した。

5 (実施例1) 神経芽細胞腫細胞でのシスプラチンによるp73および Δ Np73の発現誘導

10 神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞をシスプラチンの存在下(0, 5, 10, 25 μ Mの濃度)、24時間培養した。MTTアッセイにより、生存細胞数を求めると、シスプラチンの用量に依存して、生存細胞の減少が認められた。データーを図1に示すが、これは3回の実験の平均値(±標準偏差)である。同時に、sub-G1 DNA量を有する細胞の数も計数した。これらのデーターも図1に示す。

15 次に、SH-SY5Y細胞をシスプラチンの存在下(0, 10, 25 μ Mの濃度)、36時間培養した。各培養物から全細胞タンパク質(40 μ g)を抽出した。p73 α またはp53の発現レベルを各々について、p73 α 特異的抗体(Ab-1)またはp53特異的抗体(D0-1)を使用する免疫ブロット分析(上記)によって決定した。結果を図2に示す。サイズマーカーを図の左側に示す。「*」印は、p73 α 特異的抗体で認識されるp73 α より移動度の早いバンドであり、 Δ Np73 α の推定分子量(62 kDa Pozniakら)と一致する。

20 そこで、同様にSH-SY5Y細胞をシスプラチンの存在下(0, 1, 2, 5, 10, 25 μ Mの濃度)、24時間培養した。培養後、トータルRNAを調製して、半定量的RT-PCRを実施した(上記)。PCRの反応液を2.5%アガロースゲル上で電気泳動した。結果を図3に示す。図中、GAPDHの発現が対照として示されている。図3の結果から、 Δ Np73 α の発現がシスプラチンの用量に依存して増加することが分かる。

25 (実施例2) p73 α による Δ Np73の発現誘導

SH-SY5Y細胞をlacZ(Ad-lacZ)、p53(Ad-p53)、またはHA-p73 α (Ad-p73 α)を発現する組換えアデノウイルスで感染させた(MOI: 10)。感染の36時間後、全細胞

溶解物(40 μ g)を調製し、抗 p73 α 抗体、または抗 p53 抗体を用いて、ウエスタンブロットを行った。結果を図 4 に示す。図中、レーン 1 は、Ad-lacZ に、レーン 2 は、Ad-p53 に、レーン 3 は、Ad-p73 α に対応する。図から明らかなように、HA-p73 α の発現は、 Δ Np73 の発現を誘導するが、p53 の発現は、発現誘導を起こさない。

同様に、SH-SY5Y 細胞を lacZ(Ad-lacZ)、p53(Ad-p53)、または HA-p73 α (Ad-p73 α) を発現する組換えアデノウイルスで感染させた(MIO: 10)。感染の 24 時間後、トータル RNA(20 μ g)を調製し、今度は Δ Np73 特異的プローブを用いて、ノーザンブロットを行った。臭化エチジウムの染色の結果を図 5 に示す。図中、レーン 1 は、Ad-lacZ に、レーン 2 は、Ad-p53 に、レーン 3 は、Ad-p73 α に対応する。ここでも、レーン 3 で Δ Np73 の発現の誘導が確認された。

さらに、前記のアデノウイルスに感染した(MIO: 10) SH-SY5Y、SK-N-AS、または SK-N-BE 細胞からトータル RNA を調製し、RT-PCR (上記)を行った。結果を図 6 に示す。図中、GAPDH の発現が対照として示されている。やはり、上記と同様な結果が得られ、p73 α または p73 β による Δ Np73 の発現の誘導が明らかである。

すべての試験結果は、p73 α が Δ Np73 α のアップレギュレーションを起こすことを示している。

(実施例 3) Δ Np73 プロモーター領域内の p73 特異的結合配列の同定

(ルシフェラーゼ・リポーターアッセイ)

アッセイ用の各種ルシフェラーゼリポーター構築体、pGL2- Δ Np73P(-2600)、pGL2- Δ Np73P(-1245)、pGL2- Δ Np73P(-1082)、pGL2- Δ Np73P(-911)、pGL2- Δ Np73P(-786)、pGL2- Δ Np73P(-619)、pGL2- Δ Np73P(-203)、pGL2- Δ Np73P(-184)、pGL2- Δ Np73P(-100)、pGL2- Δ Np73P(-80)、pGL2- Δ Np73P(-76)、pGL2- Δ Np73P(-71)、pGL2- Δ Np73P(-66)、pGL2- Δ Np73P(-63) および pGL2- Δ Np73P(+1)を上記のように作製した。これらの構築体の各々をルシフェラーゼ・リポーターアッセイ(上記)に使用し、p73 α と共発現させた。ア

ッセイの結果を図 7 に示す。データーは、少なくとも 3 回の試験の平均値（標準偏差）である。エキソン 3' から上流 2.6 kb 配列を含む pGL2- Δ Np73P(-2600) は、プロモーターのないベクターと比較して、ルシフェラーゼの発現において約 90 倍の増加を示した。この結果から、-71 位までの欠失は、ルシフェラーゼ活性を著しく失活させることが明らかとなった。

図 8 は、 Δ Np73 プロモーター領域の塩基配列を示す。推定 p73 結合部位には、下線が施され、推定 TATA エLEMENT は囲まれている。図にはさらにコンセンサス p53 標的配列と推定 P-73 結合配列の配列比較が示されている。図中、R はプリン、Y はピリミジン、そして W はアデニンかチミジンを表す。2 個のミスマッチは、小文字(c, g)で示されている。

推定 p73 結合部位が Δ Np73 プロモーターの活性化に不可欠であると考えられたので、この 20bp の配列(5'-GGGCAAGCTGAGGCCTGCCC-3') (配列番号 1) を前記ルシフェラーゼプラスミド pGL2 プロモーターの上流域にサブクローニングして、pGL2- Δ Np73P(-76/-57) を得た。200 ng のレポータープラスミド pGL2- Δ Np73P(-100)、または pGL2- Δ Np73P(-76/-57)、20 ng の pRL-TK をコードする Renilla ルシフェラーゼ cDNA、100 ng の発現プラスミド(p53、p63 γ 、HA-p73 α または HA-p73 β) で SAOS-2 細胞を共トランスフェクトさせた。(上記)。ルシフェラーゼ活性を測定したデーターを図 9 (pGL2- Δ Np73P(-100)) および図 10 (pGL2- Δ Np73P(-76/-57)) に示す。データーは、平均値（標準偏差）である。図に示す結果は、予想通り p73 α および p73 β が pGL2- Δ Np73P(-76/-57) のルシフェラーゼ発現において著しい増加をもたらしたことを示している。ともに、p53 および p63 γ は、増加の程度が低い。従って、 Δ Np73 プロモーターの p73 特異的活性化にこの 20bp の配列からなる p73 結合 ELEMENT が関与していることが分かった。

(電気泳動移動度アッセイ)

配列特異的な競合 DNA および配列非特異的な競合 DNA を用いて、さらに前記 p73

特異的結合配列をブロックし、該配列で表される p73 結合エレメントの関与を確認した。この p73 特異的結合配列を含む 61bp のオリゴヌクレオチドフラグメント (5'-GTGCGGTCCAACACATCACCGGGCAAGCTGAGGCCTGCCCCGGAAGTTGGATGAATACTCAT-3') (配列番号 13) を [γ - 32 P]ATP で標識して、インビトロトランスレーションした p53 (図 11 のレーン 2)、HA-p73 α (レーン 3~7)、HA-p73 β (レーン 8~12)、プログラムされていない網状赤血球溶解液 (レーン 1) と共にインキュベートした。結果を図 11 に示す。図中、レーン 4 およびレーン 9 は、10 倍モル過剰の配列特異的な競合 DNA を含んでいた結合反応の結果である。レーン 5 およびレーン 10 は、10 倍モル過剰の配列非特異的な競合 DNA を含んでいた結合反応の結果である。配列非特異的な競合 DNA とは、前記 p73 特異的結合配列の 5'-または 3'-末端部分のみを含むもので、後述の図 12 に示す C1 および C3 である。タンパク質 DNA 複合体をスーパーシフトさせるために、抗 HA 抗体を反応混合物に加えた (レーン 6 および 11)。前免疫血清をネガティブコントロールに使用した (レーン 7 および 12)。タンパク質 DNA 複合体およびスーパーシフトした複合体をそれぞれ、鋳印 (塗った、または空白) で示す。p73 α および p73 β は、共に前記オリゴヌクレオチドフラグメントに特異的に結合した。

さらに、インビトロトランスレーションした HA-p73 β (レーン 2~10) またはプログラムされていない網状赤血球溶解液 (レーン 1) を含む反応液を同様に、電気泳動移動度アッセイにかけた。結果を図 12 に示す。使用した標識されていない競合オリゴヌクレオチドの配列を図に下部に示し、その内 p73 特異的結合配列を下線で表している。競合オリゴヌクレオチド (DNA) は、1 または 10 倍過剰で使用した。図の上部に傾斜で表している。また、タンパク質 DNA 複合体の位置を鋳印で表している。図から明らかなように、p73 特異的結合配列を全て有する C2 競合 DNA は、p73 β -DNA 複合体形成において効率的に競合した。しかし、C1 競合 DNA および C3 競合 DNA では、競合が失われた。P73 β でも同様な結果が得られた (図示せず)。

これらのデータから Δ Np73プロモーター内のこの塩基配列にp73が結合することによって、 Δ Np73の転写を活性化することが明らかとなった。

(実施例4) p73と Δ Np73との相互作用

293細胞を各種発現プラスミド(HA-p73 α 、HA-p73 β 、FLAG- Δ Np73 α 、および
5 FLAG- Δ Np73 β)の1種または2種で一過的にトランスフェクトした。全細胞溶解物を抗HA抗体で免疫沈降させた(上記)。沈殿したタンパク質を抗FLAG M2抗体で免疫ブロット分析した。結果を図13に示す。図中、 Δ Np73 α および Δ Np73 β は、それぞれ鏤印(塗った、または空白)で示される。 Δ Np73の両イソフォームがp73 α およびp73 β と相互作用することが明らかとなった。

10 COS7細胞を各種発現プラスミド(p53、FLAG-Np73およびFLAG-Np73 β)の1種または2種で一過的にトランスフェクトした。トランスフェクション48時間後、全細胞溶解物を調製し、抗p53(D0-1/Pab1801)と免疫沈降させ、続いて抗-FLAG M2抗体で免疫ブロット分析した。結果を図14に示す。図中、 Δ Np73 α および Δ Np73 β は、それぞれ鏤印(塗った、または空白)で示される。p53もp73 α およびp73 β
15 と相互作用することが明らかとなった。

次に、p73と Δ Np73の相互作用をルシフェラーゼ・レポーターアッセイ(上記)で確認した。SAOS-2細胞を各種発現プラスミド(p53、p73 α 、p73 β 、 Δ Np73 α 、
および Δ Np73 β)の1種または2種と、MDM2プロモーターを含むレポータープラスミドとともに共トランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、ル
シフェラーゼアッセイにかけた。結果を図15に示す。データは、平均値(標準
20 偏差)を表す。

同様に、SAOS-2細胞を各種発現プラスミド(p53、p73 α 、p73 β 、 Δ Np73 α 、
および Δ Np73 β)と、Baxプロモーターを含むレポータープラスミドとともに共ト
ランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、ルシフェラーゼアッセイ
25 にかけた。結果を図16に示す。データは、平均値(標準偏差)を表す。図15
および図16のデータからp73 α またはp73 β に誘導されるMDM2プロモーター

および Bax プロモーターの転写活性は、 $\Delta Np73\alpha$ または $\Delta Np73\beta$ によって減少させられることが分かる。

さらに、SAOS-2 細胞を各種発現プラスミド(p53、p73 α 、p73 β 、 $\Delta Np73\alpha$ 、および $\Delta Np73\beta$)の 1 種または 2 種と、 $\Delta Np73$ プロモーターを含むレポータープラスミドとともに共トランスフェクトした。トランスフェクションの 48 時間後、ルシフェラーゼアッセイにかけた。結果を図 17 に示す。データーは、平均値(標準偏差)を表す。 $\Delta Np73$ プロモーター活性は、 $\Delta Np73\alpha$ または $\Delta Np73\beta$ とともに p73 α または p73 β を共発現させると、著しく減少することが分かる。

前記の結果は、p73 α タンパク質レベルを増加させると、 $\Delta Np73$ の発現レベルが用量依存的に減少する(データー示さず)という事実と一致する。

(実施例 5) $\Delta Np73$ による p-73 またはシスプラチン誘導性アポトーシスの阻害

SK-N-BE 細胞(2×10^4 /ウエル)を Ad-p73 α (MOI:10)と Ad- $\Delta Np73\alpha$ (0、1、2、5、10、20 MOI)とで共感染させた。感染 48 時間後、生存細胞数を MTT 生存アッセイで測定した。結果を図 18 に示す。グラフは、対照の lacZ による感染と比較しての相対的な生存細胞の% (6 回の試験の平均値(±標準偏差値))を表す。 $\Delta Np73\alpha$ のレベルが上昇すると、p73 α に誘発されるアポトーシスが減少することが分かる。

SH-SY5Y 細胞(5×10^3 /ウエル)を Ad-lacZ または Ad- $\Delta Np73\alpha$ (MOI: 10)で感染させた。感染 6 時間後、その細胞をシスプラチン (0、5、10、25 μ M の濃度)で 24 時間、処理した。生存細胞数を MTT 生存アッセイで測定した。結果を図 19 に示す。グラフは、6 回の試験の平均値(±標準偏差値)を表す。さらに、Ad-lacZ または Ad- $\Delta Np73\alpha$ (共に MOI:10)で感染させた細胞を 25 μ M シスプラチンと処理 24 時間後、写真撮影したものを図中に示す。SH-SY5Y 細胞のシスプラチン誘導性アポトーシスが $\Delta Np73\alpha$ 感染によって阻害されることが明らかとなった。

(引用文献)

1. Kaghad, M., Bonnet, H., Yang, A., Creancier, L., Biscan, J. C., Valent, A., Minty, A., Chalon, P., Lelias, J. M., Dumont, X., Ferrara, P., MeKeon, F. & Caput, D. (1997) *Cell* 90, 809-819.
2. De Laurenzi, V., Costanzo, A., Barcaroli, D., Terrinoni, A., Falco, M., Annicehiarico-Petruzzelli, M., Leyrero, M. & Melino, G. (1998) *J. Exp. Med.* 188, 1763-1768.
3. De Laurenzi, V., Catani, M., Costanzo, A., Terrinoni, A., Corazzari, M., Levrero, M., Knight, R. & Melino, G. (1999) *Cell Death Differ.* 6, 389-390.
4. Jost, C., Mann, M. & Kaelin, W. G., Jr. (1997) *Nature* 389, 191-194.
5. Schwab, M., Prarni, C. & Amler, L. C. (1996) *Genes Chromosomes Cancer* 16, 211-229.
6. Ikawa, S., Nakagawara, A. & Ikawa, Y. (1999) *Cell Death Differ.* 6, 1154-1161.
7. Lissy, N. A., Davis, P. K., Irwin, M., Kaelin, W. G. Jr & Dowdy, S. F. (2000) *Nature* 407, 642-645.
8. Marin, M. C., Jost, C. A., Irwin, M. S., DeCaprio, J. A., Caput, D. & Kaelin, W. G. Jr. (1998) *Mol. Cell. Biol.* 18, 6316-6324.
9. Higashino, F., Pipas, J. M. & Shenk, T. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 15683-15687.
10. Steegenga, W. T., Shyarts, A., Riteco, N., Bos, J. L. & Jochemsen, A. G. (1999) *Mol. Cell. Biol.* 19, 3885-3894.
11. Haupt, Y., Maya, R., Kazanietz, A. & Oren, M. (1997) *Nature* 387, 296-299.
12. Zeng, X., Chen, L., Jost, C. A., Maya, R., Keller, D., Wang, X., Kaelin, W. G. Jr., Oren, M., Chen, J. & Lu, H. (1999) *Mol. Cell. Biol.* 19, 3257-3266.
13. Zaika, A. I., Kovalev, S., Marchenko, N. & Moll, U. M. (1999) *Cancer Res.* 59, 3257-3263.
14. Chen, C. L., Ip, S. M., Cheng, D., Wong, L. C. & Ngan, H. Y. (2000) *Clin.*

Cancer Res. 6, 3910-3915.

15. Irwin, M., Mar, M. C., Phillips, A. C., Seelan, R. S., Smith, D. I., Liu, W., Flores, E. R., Tsai, K. Y., Jacks, T., Vousden, K. H. & Kaclin, W. G. Jr. (2000) Nature 407, 645-648.

5 16. Stiewe, T. & Putzer, B. M. (2000) Nat. Genet. 26, 464-469.

17. Zaika, A., Irwin, M., Sansome, C. & Moll, U. M. (2001) J. Biol. Chem. 276, 11310-11316.

18. Pozniak, C. D., Radinovic, S., Yang, A., McKeon, F., Kaplan, D. R. & Miller, F. D. (2000) Science 289, 304-306.

10 19. Ozaki, T., Naka, M., Takada, N., Tada, M., Sakiyama, S. & Nakagawara, A. (1999) Cancer Res. 59, 5902-5 907.

産業上の利用可能性

以上説明したように、本発明に従えば、 $\Delta N p 73$ プロモーターの機能が解明され、該プロモーターの活性を制御することにより p 73 アポトーシス活性を調節できるようになった。この p 73 アポトーシス活性を利用して、腫瘍細胞のアポトーシスを促進させ、抗腫瘍効果を達成できる。

また、本発明により、p 73 による腫瘍細胞のアポトーシス調節剤をスクリーニングすることが可能となった。このようなアポトーシス調節剤は、腫瘍（特に、悪性腫瘍）の遺伝子治療を含む化学療法に有用である。

請求の範囲

1. $\Delta N p 73$ とのヘテロオリゴマー形成を利用することよりなる、p 73 のアポトーシス誘導調節剤。
2. $\Delta N p 73$ とのヘテロオリゴマー形成を利用することよりなる、p 53 のアポトーシス誘導調節剤。
3. 配列番号 1 に記載の塩基配列を利用することよりなるアポトーシス誘導調節剤。
4. 配列番号 1 に記載の塩基配列にハイブリダイズする塩基配列を含む核酸からなるアポトーシス誘導調節剤。
5. p 73 遺伝子および $\Delta N p 73$ 遺伝子からなる p 53 および p 73 の転写活性調節剤。
6. 配列番号 1 に記載の塩基配列を有する核酸を使用する、腫瘍細胞におけるアポトーシス調節剤のスクリーニング方法。
7. 請求項 6 に記載のスクリーニング方法によって得ることができる腫瘍細胞のアポトーシス調節剤。

図1

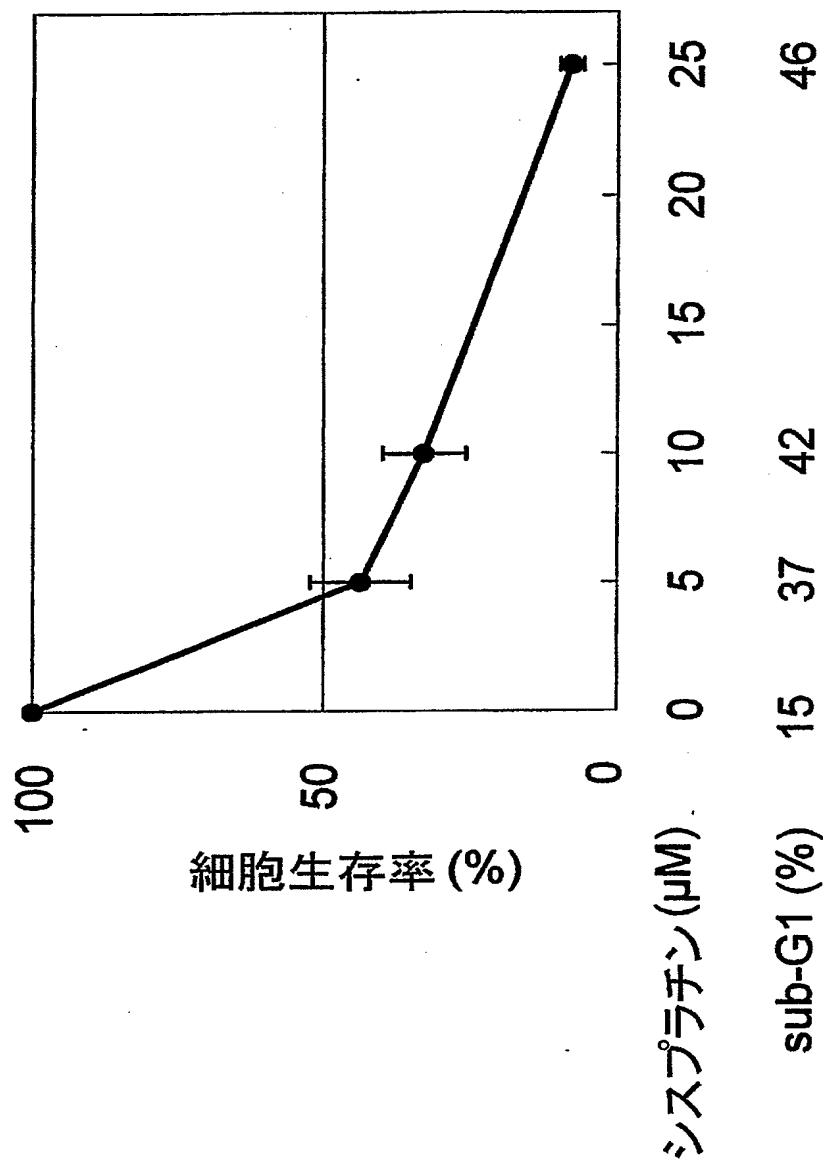


図2

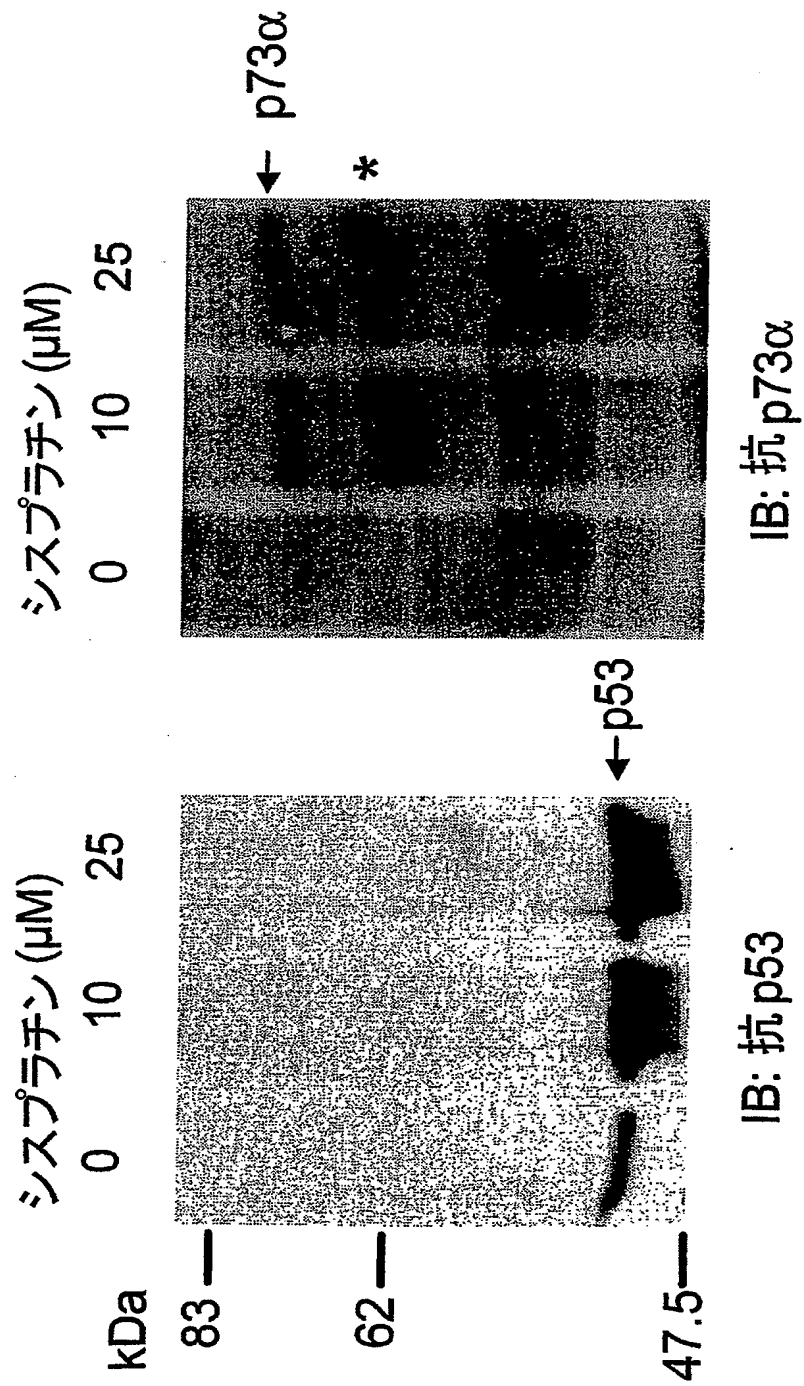


図3

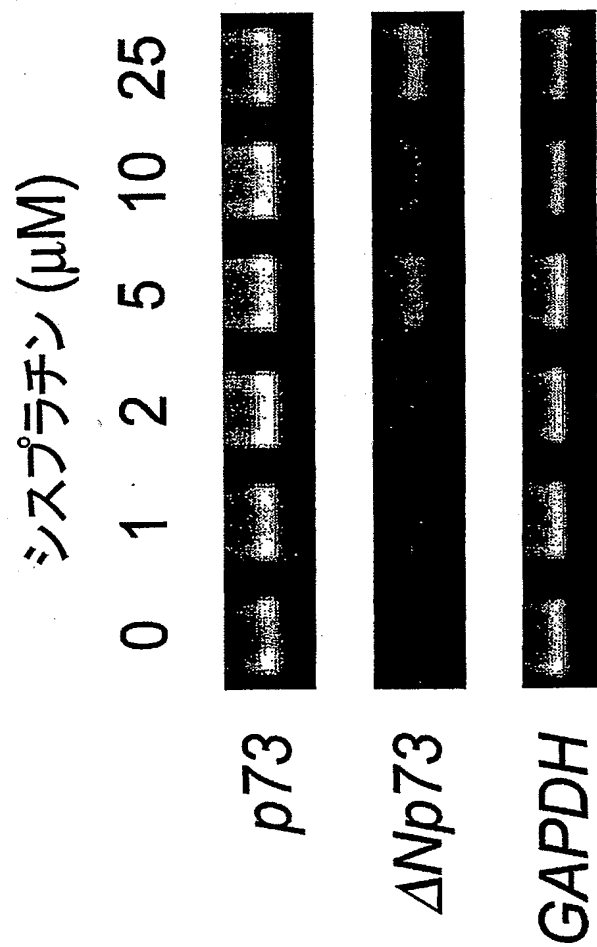


図4

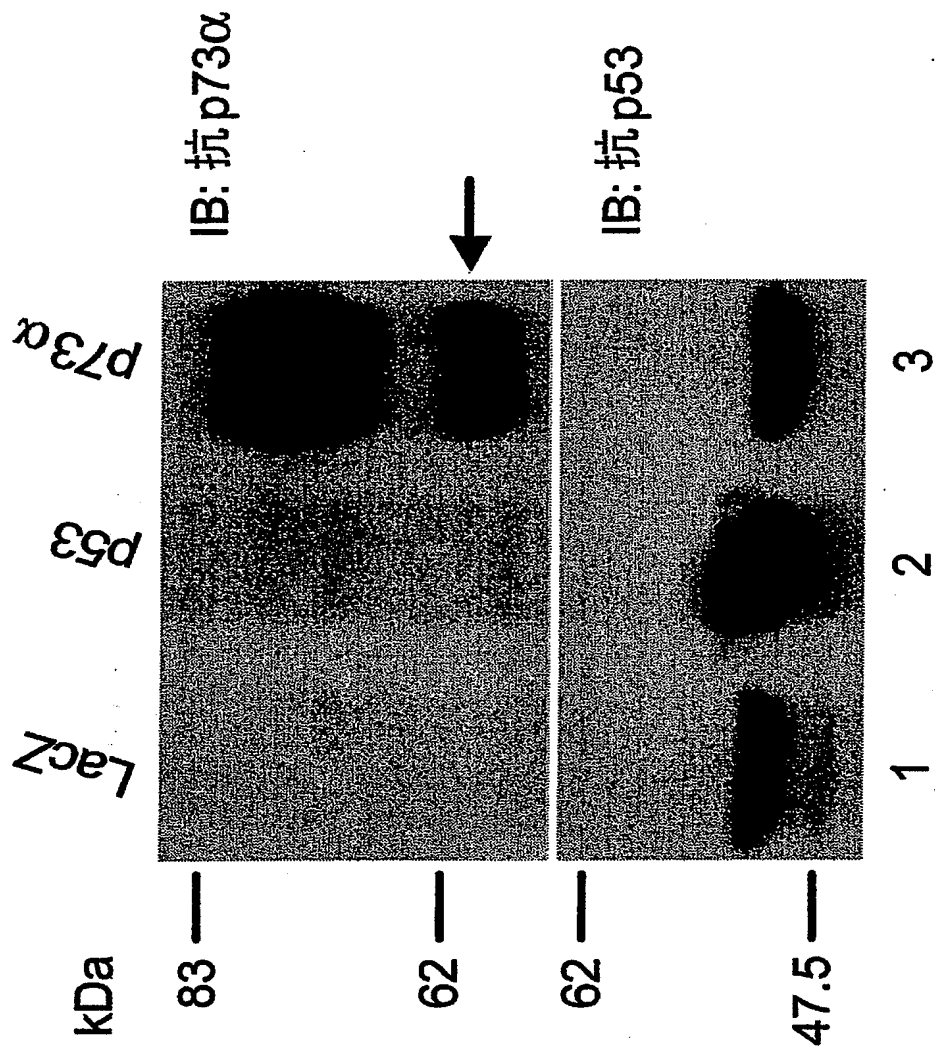


図5

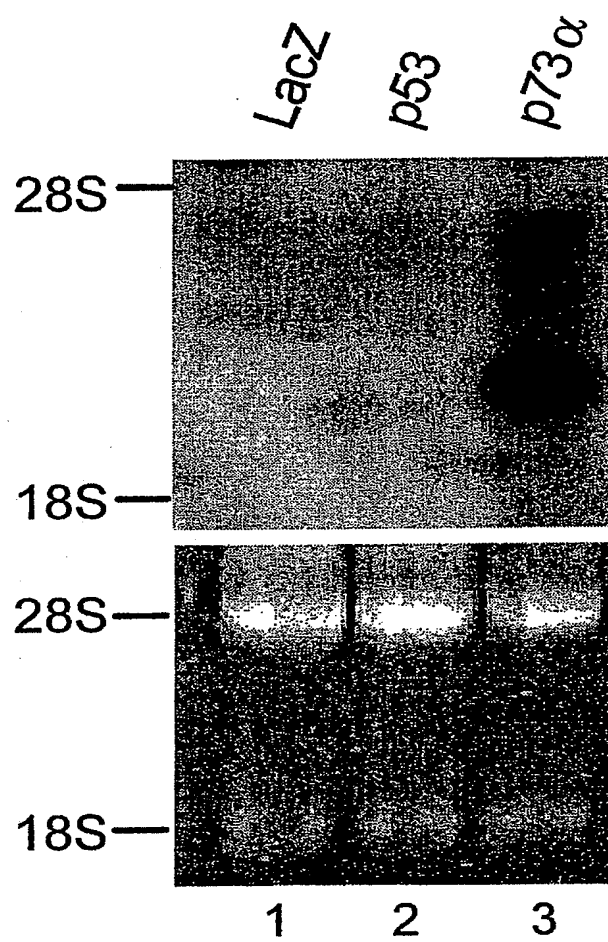


図6

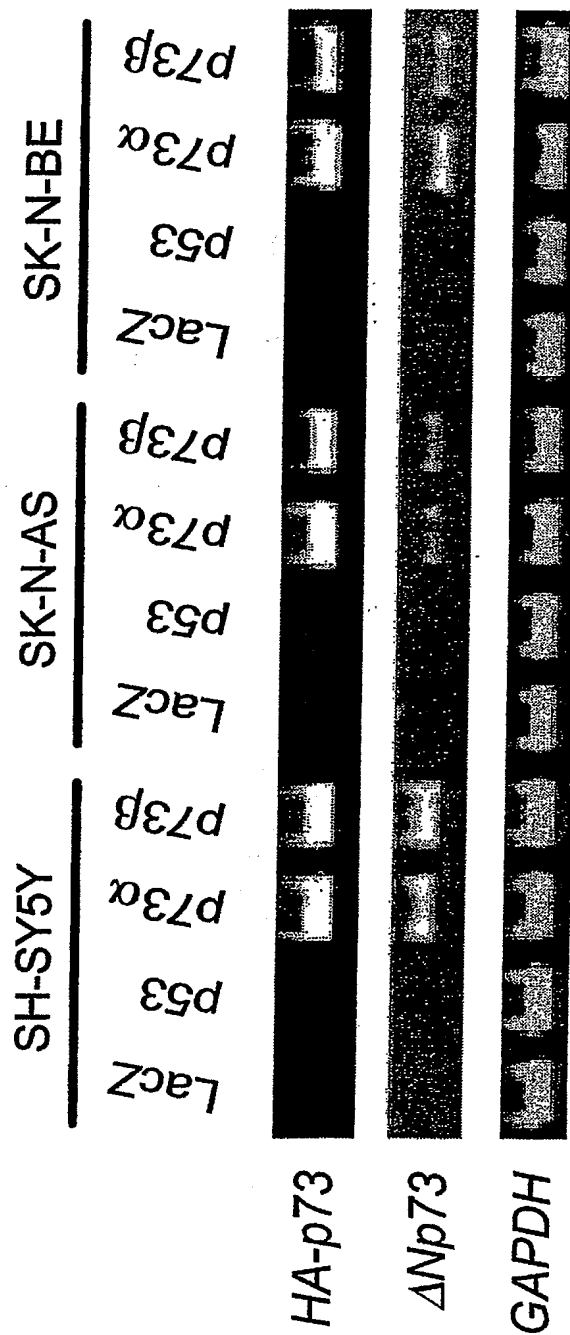
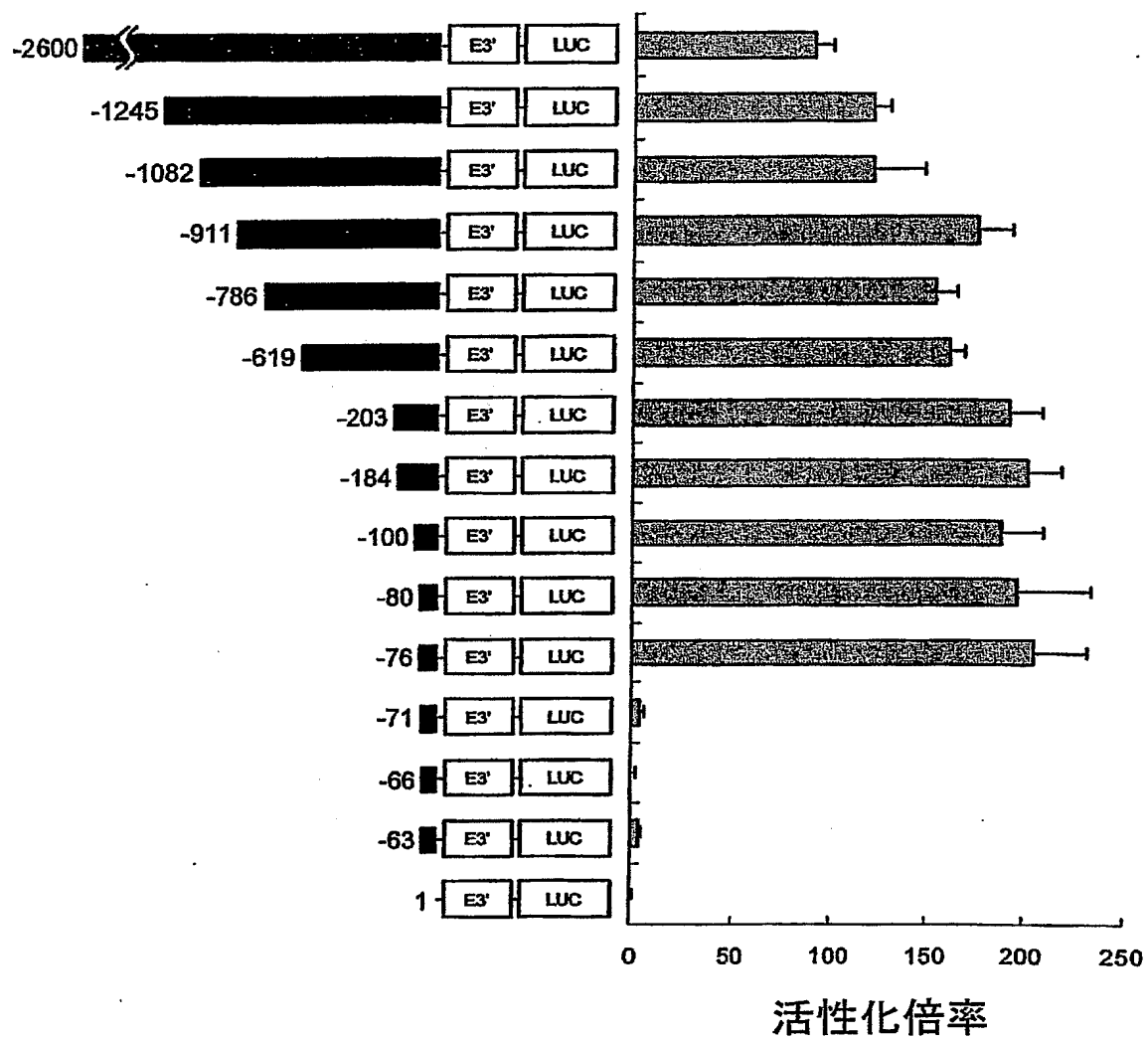


図7



 8

-240 GGAACAGAGG CTGCTTTACG GGTGAGGGC CTGGGGCCC CCGAGCCTTC CCCAGGCAGG
 -180 CAGCATCTCG GAAGGAGCCC TGGTGGTTT AATTATGGAG CCGCGGCTGA CCGCGTCCC
 -120 CGCCCTCCCC ACGAGCCTC CTTGGTGGG TCCAACACAT CACCGGGCAA GCTGAGGCCT
 -60 GGCCCGGACT TGGATGAATA CTCATGAGGA ATAAAGGGT GGGCCGCGGG TTTTGTGTT
 1 GGATTCAGCC AGTTGACAGA ACTAAGGGAG ATGGGAAAAG CGAAAATGCC AACAAACGGC

8/20

p53 コンセンサス標的配列 RRRRCWNGYY RRRCWNGYY
 ΔNp73 内の p73 標的配列 GGCAAGCTg AGGCcTGCCC

図9

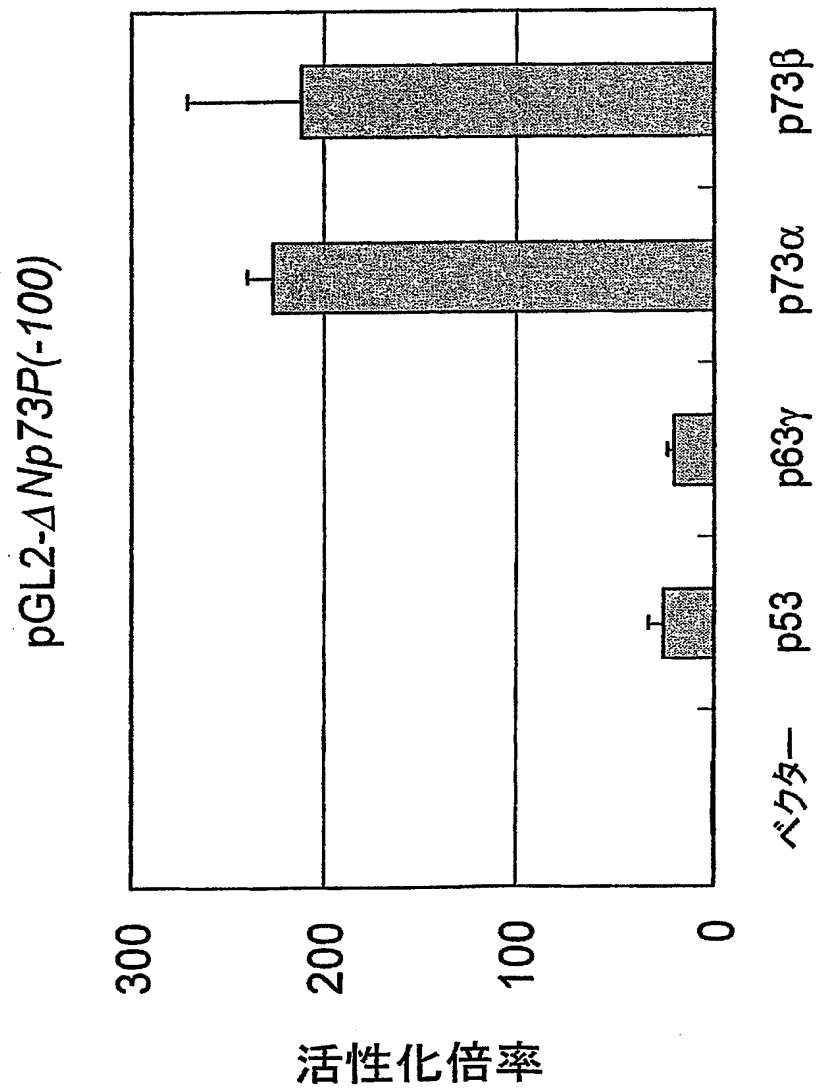


図10

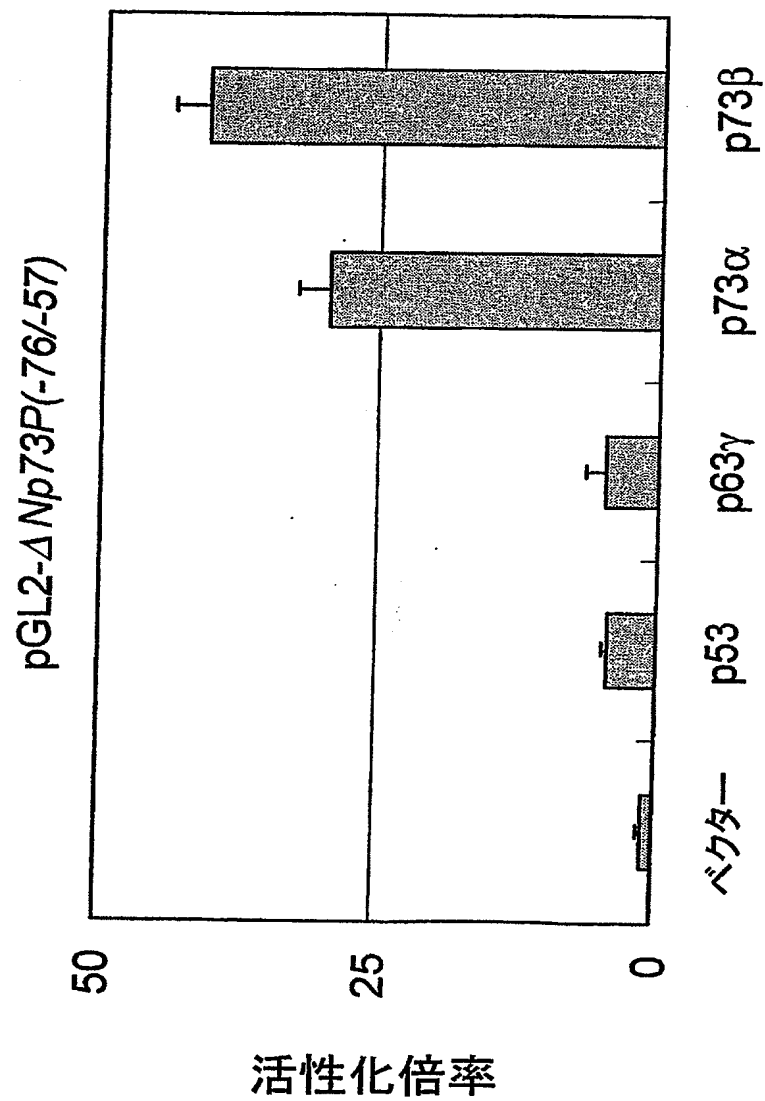
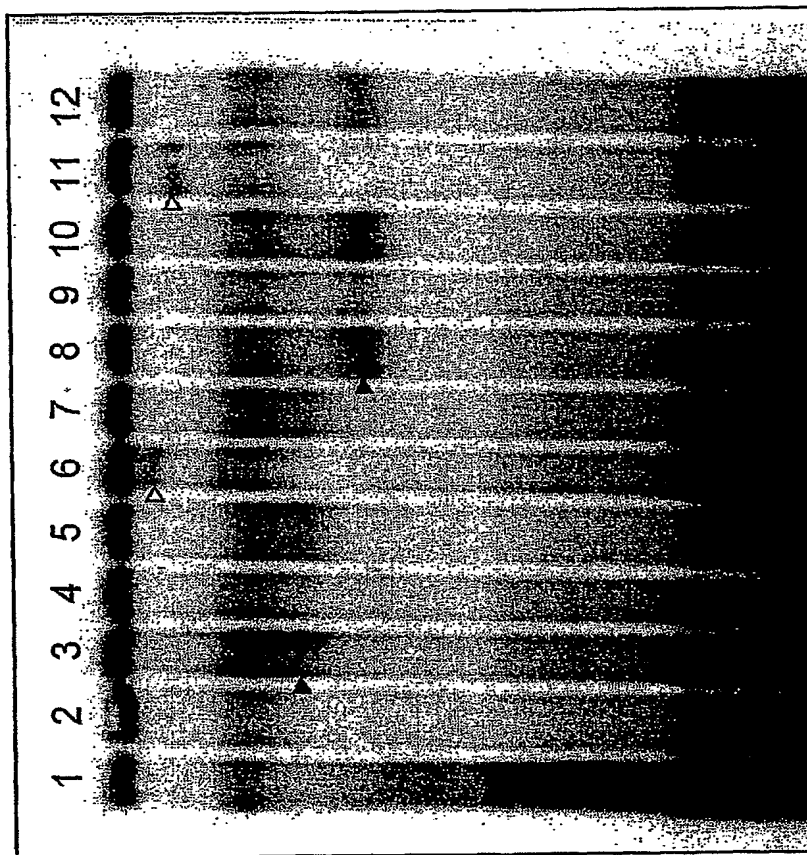


図11



-	-	+	-	-	-	+
-	-	+	-	-	+	-
-	-	+	-	+	-	-
-	-	+	+	-	-	-
-	-	+	-	-	-	-
-	+	-	-	-	-	+
-	+	-	-	-	+	-
-	+	-	-	+	-	-
-	+	-	+	-	-	-
-	+	-	-	-	-	-
+	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-

p53
HA-p73α
HA-p73β
特異的競合剤
非特異的競合剤
抗HA
対照 IgG

図12

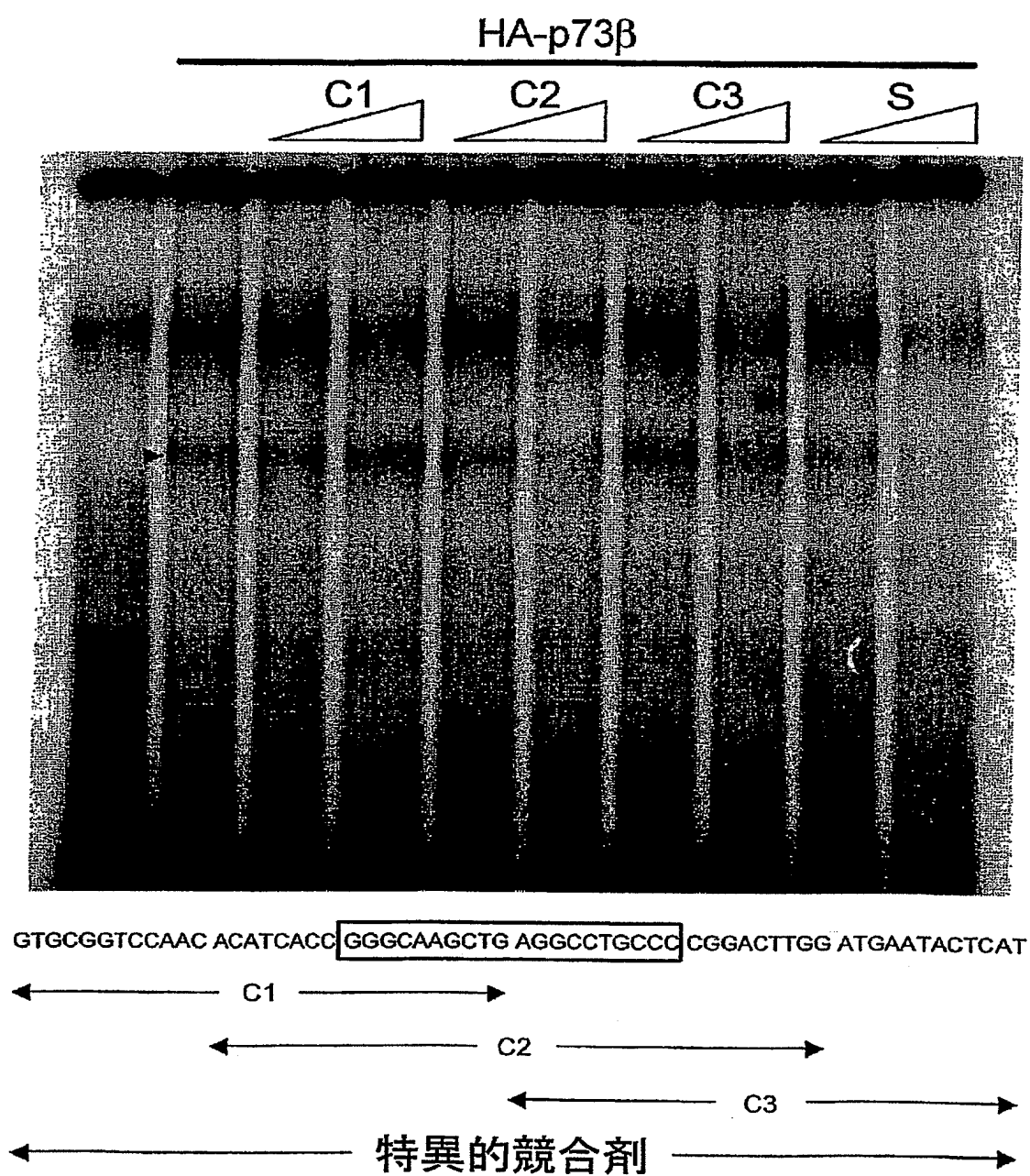


図 14

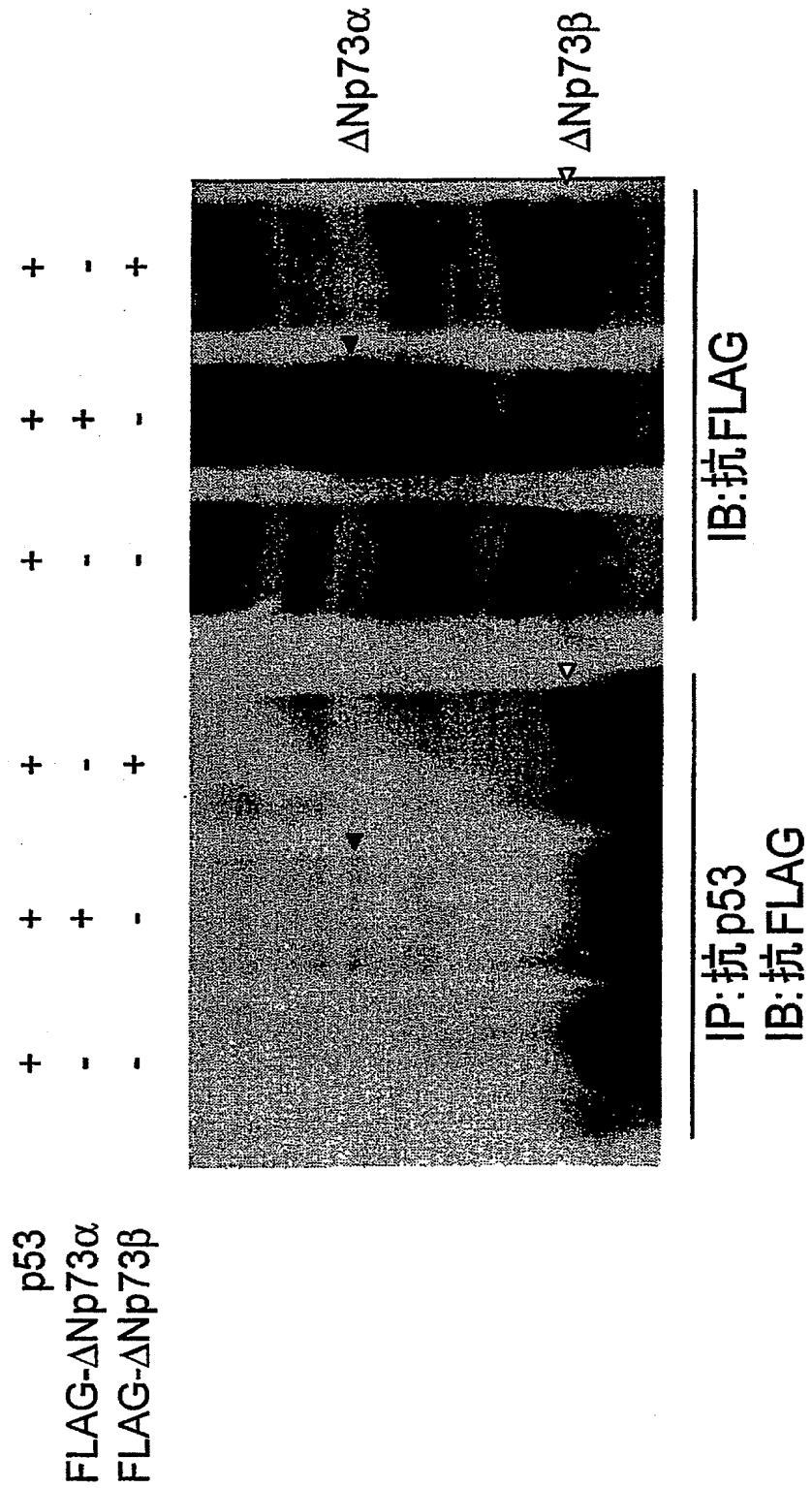


図15

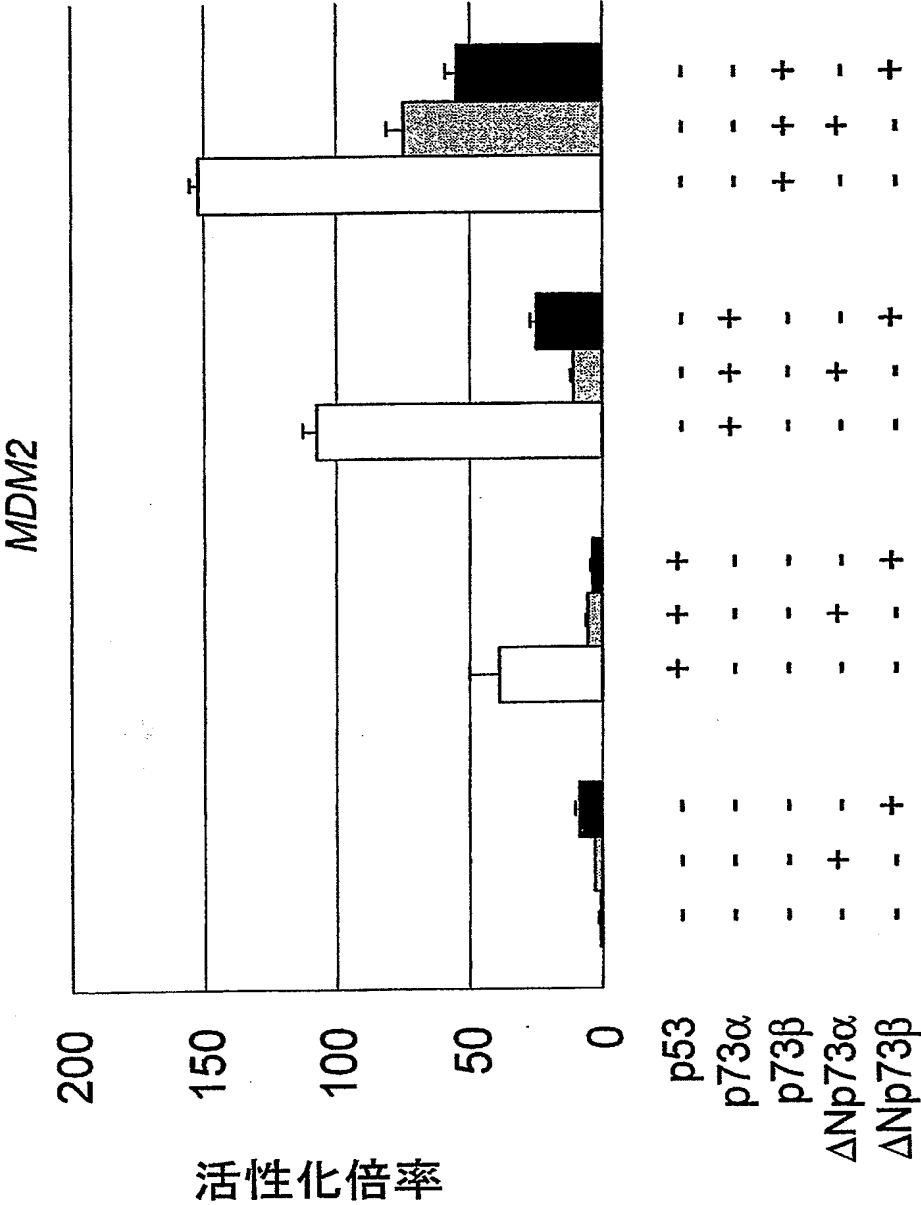


図16

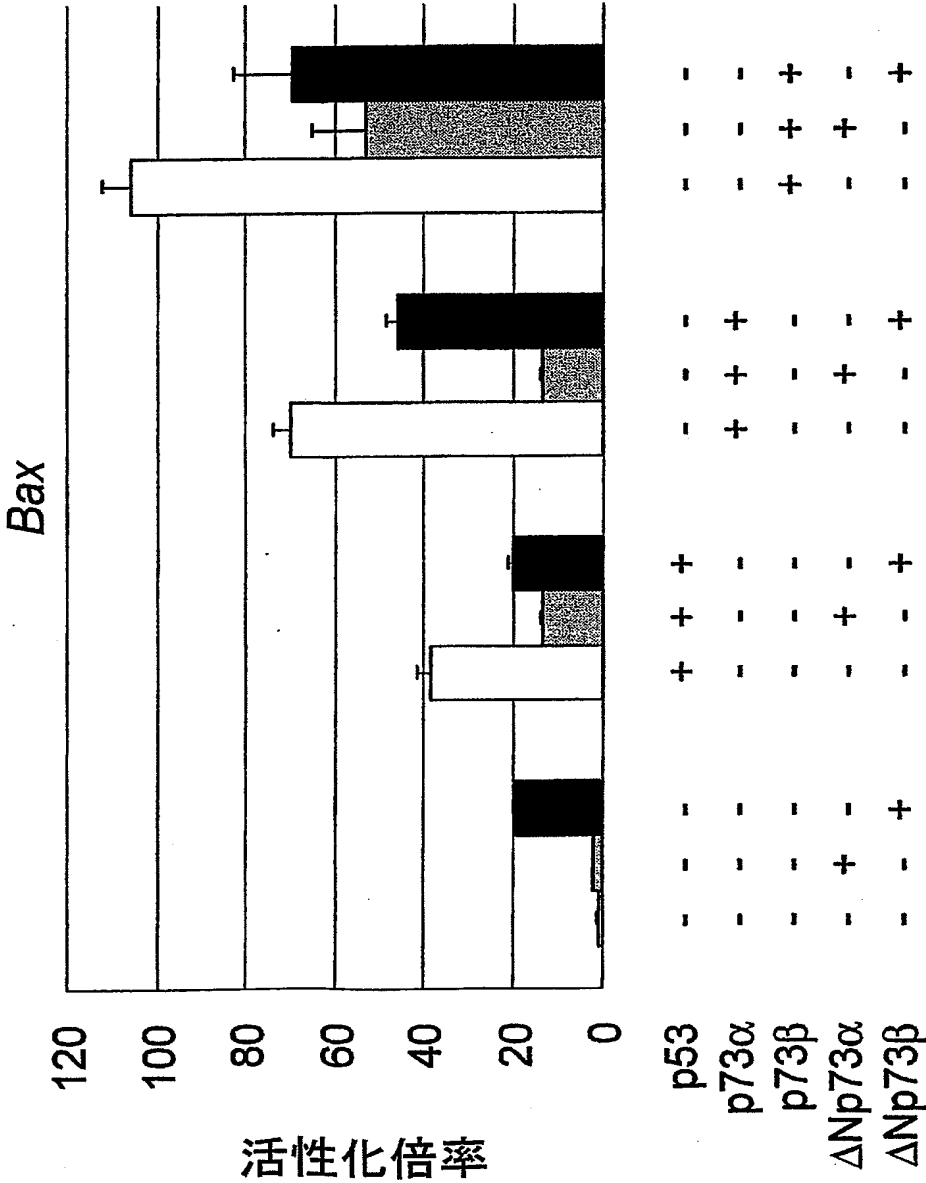


図17

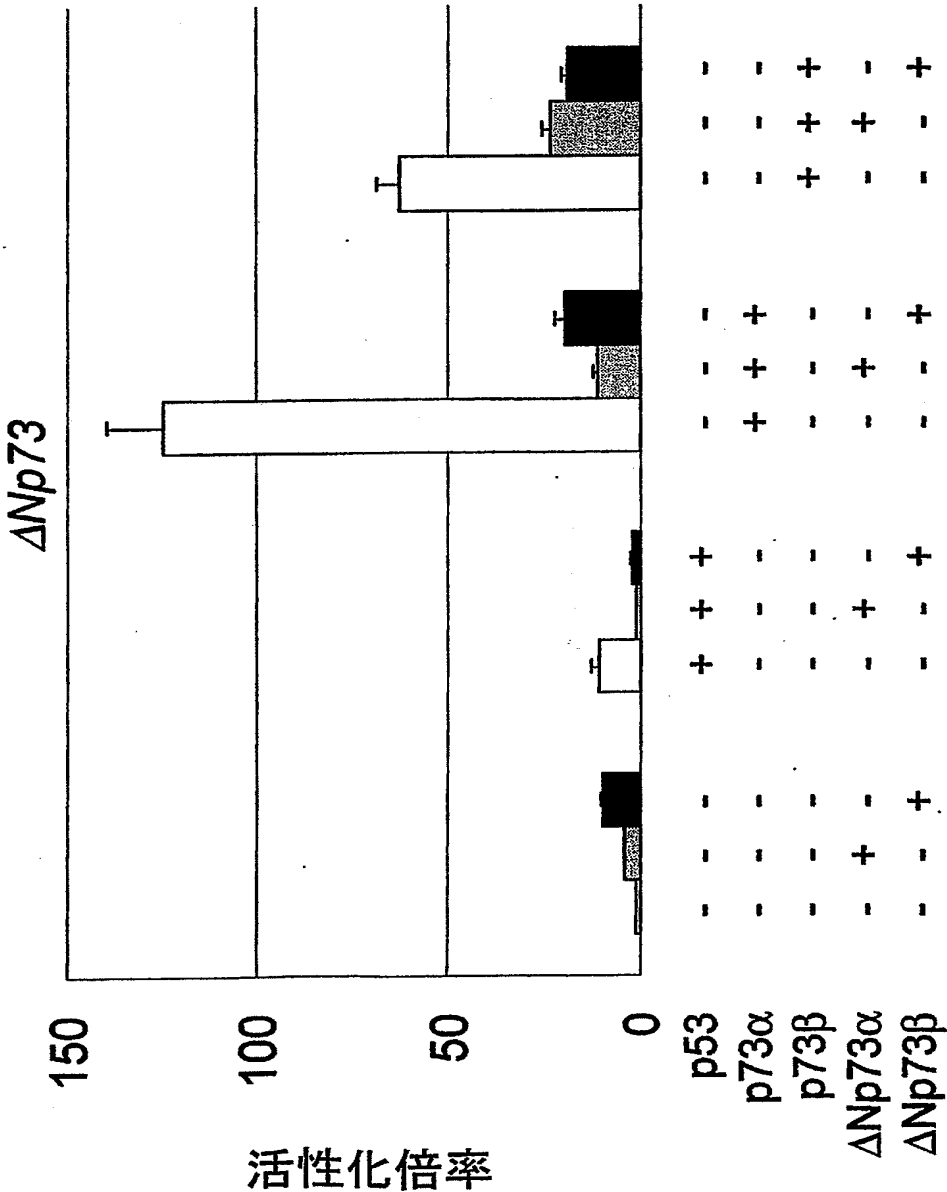


図18

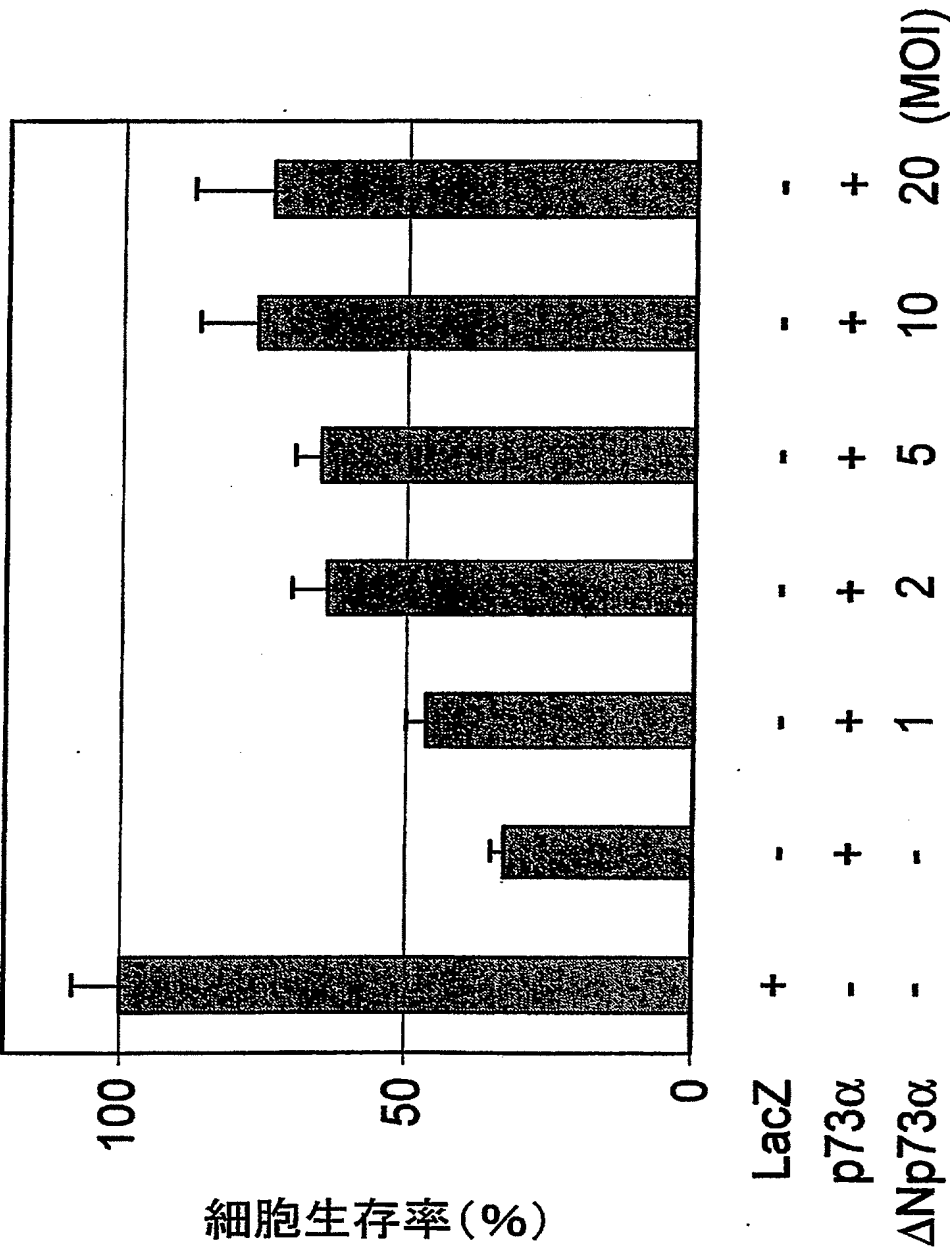
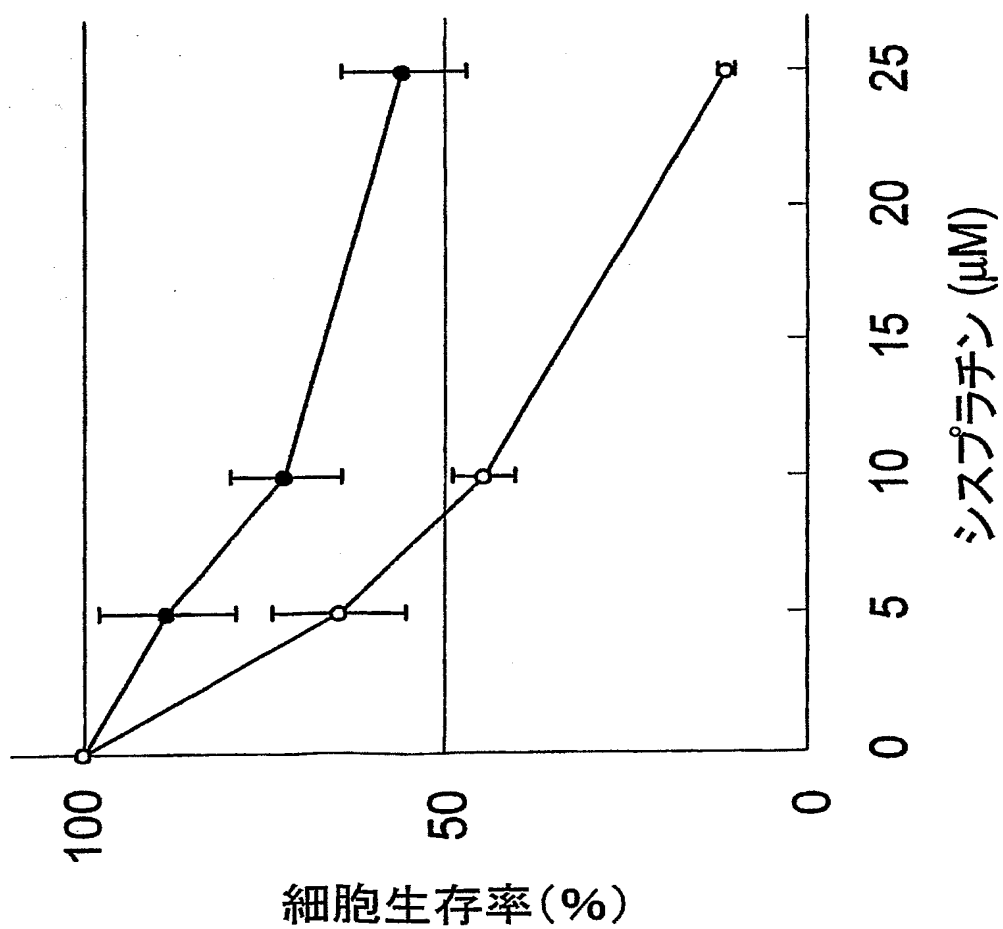
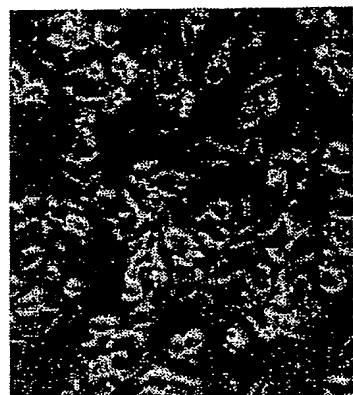


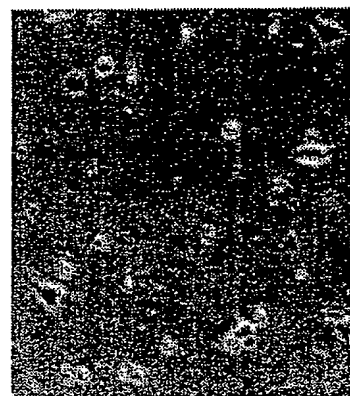
図19



シスプラチン 25 μM for 24 h

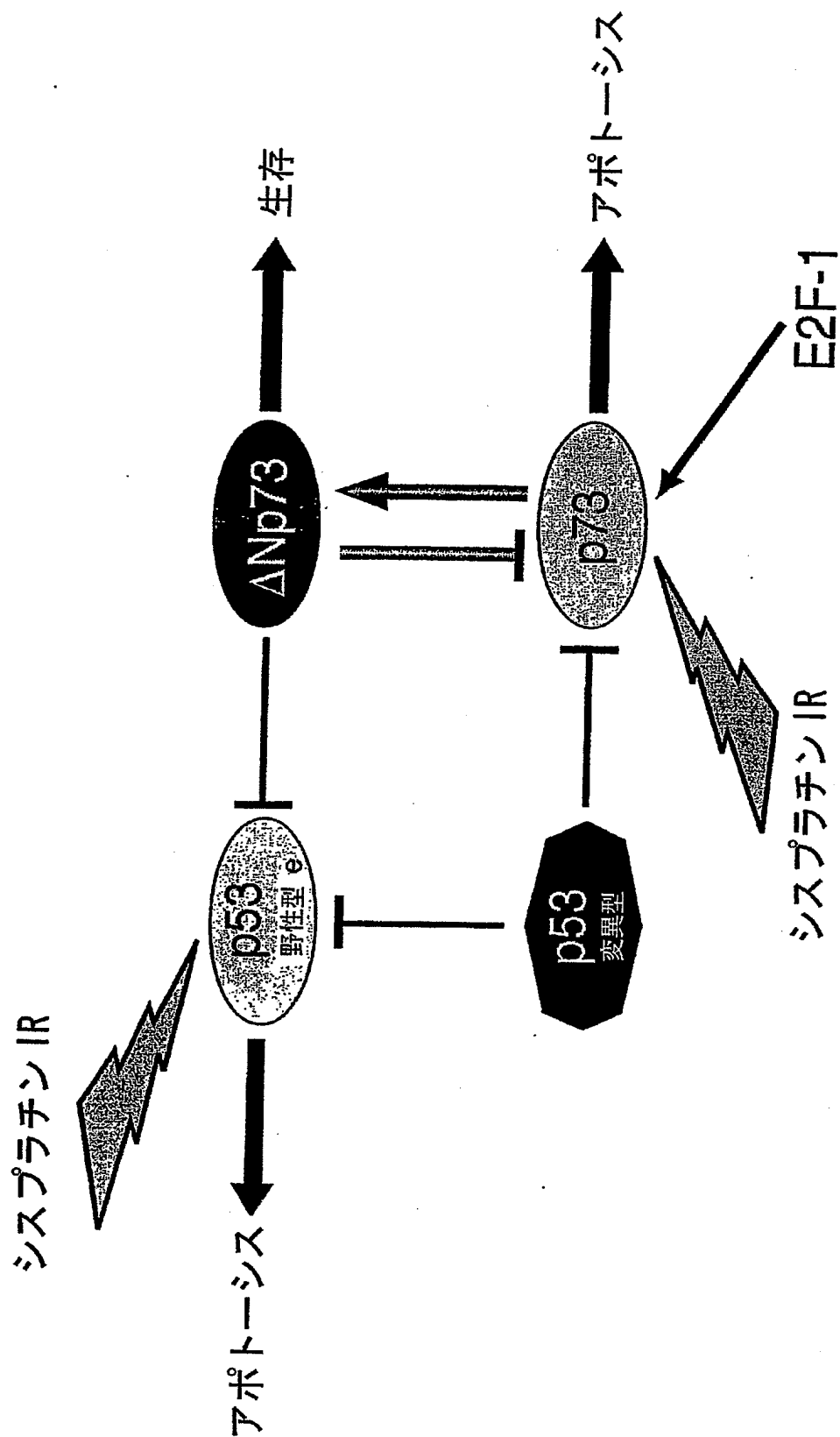


Ad-ΔNp73α (Moi = 10)



Ad-LacZ (Moi=10)

図20



SEQUENCE LISTING

<110> Hisamitsu Pharmaceutical Co., Inc.

5 <120> Regulators for p73 apoptosis-inducing activity

<130> FP03-0002-00WO-HM

<140>

10 <141>

<150> JP 2002/17486

<151> 2002-01-25

15 <160> 17

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

20 <211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

25 gggcaagctg aggcctgccc

20

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

5 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

10 <400> 2

tggttaccc atacgatgtt c

21

<210> 3

15 <211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

20 <223> Primer

<400> 3

gtgctggact gctggaaagt

20

25

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

5 <220>

<223> Primer

<400> 4

tctggaacca gacagcacct

20

10

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

15 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

20 <400> 5

gtgctggact gctggaaagt

20

<210> 6

25 <211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

5

<400> 6

cgcctacat gctgtacgtc

20

10

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

15

<220>

<223> Primer

20

<400> 7

gtgctggact gctggaaagt

20

25

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

5 <220>

<223> Primer

<400> 8

acctgacctg ccgtctagaa

20

10

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

15 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

20 <400> 9

tccaccaccc tgttgctgta

20

<210> 10

25 <211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

5

<400> 10

ggattcagcc agttgacaga acta

24

10

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

15

<220>

<223> Primer

<400> 11

gtgctggact gctggaaagt

20

20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

25

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 12

5 ccagggagga tctgtagctg

20

<210> 13

<211> 20

10 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

15

<400> 13

tgaaccctac actgcagcaa

20

20 <210> 14

<211> 61

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

25 <220>

<223> Probe

<400> 14

gtgoggtcca acacatcacc gggcaagctg aggcctgccc cggacttgga tgaataactca 60
t 61

5

<210> 15

<211> 300

<212> DNA

10 <213> Homo sapience

<400> 15

ggaacagagg cagcatctcg cccctctccc gcccggact ggattgagcc ctgctttacg 60
gaaggagccc acgcagcctc tggatgaata agttgacaga gggtaggggc tggtagggttt 120
15 cttggtgcgg ctcatgagga actaaggag ctggggcccc aattatggag tccaacacat 180
ataaaggggt atgggaaaag cgcagccttc cggcgctga cacgggcaa cccaggcagg 240
ccggcgctccc gctgaggcct gggccgcggg cgaaaatgcc tttgttgtt aacaaacggc 300

20 <210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapience

25 <220>

<221> misc_feature

<223> y=c, t, g

<400> 16

rrrcwwgyyy rrrcwwgyyy

20

5

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

10

<213> Homo sapience

<400> 17

gggcaagctg aggcctgccc

20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/00605

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K48/00, 38/17, 45/00, A61P35/00, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K38/00-38/58, 45/00-45/08, 48/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	KAGHAD, Mourad et al., Monoallelically Expressed Gene Related to p53 at 1p36, a Region Frequently Deleted in Neuroblastoma and Other Human Cancers, Cell, 22 August, 1997 (22.08.97), Vol.90, No.4, pages 809 to 819	7 4-6
X A	POZNIAC, Christine D. et al., An Anti-Apoptotic Role for the p53 Family Member, p73, During Developmental Neuron Death, Science, 14 July, 2000 (14.07.00), Vol.289, No.5477, pages 304 to 306	7 4-6
A	GOTTLIEB, Tanya M. et al., p53 and apoptosis, Seminars in Cancer Biology, 1998, Vol.8, pages 359 to 368	4-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
30 April, 2003 (30.04.03)Date of mailing of the international search report
20 May, 2003 (20.05.03)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/00605

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TAKADA, Naoyuki et al., Identification of a Transactivation Activity in the COOH-Terminal Region of p73 Which Is Impaired in the Naturally Occurring Mutants Found in Human Neuroblastomas, Cancer Research, 15 June, 1999 (15.06.99), Vol.59, No.12, pages 2810 to 2814	4-7

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/00605

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 1-3
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
(See extra sheet)
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/00605

Continuation of Box No.I-2 of continuation of first sheet(1)

In the expression "an agent controlling apoptosis induction with the use of - - - " as set forth in claims 1 to 3, it is considered that the term "an agent controlling apoptosis induction" means "an agent which controls the induction of apoptosis" as stated in the description. Therefore, the term "with the use of - - -" seemingly qualifies "an agent". However, the expression "an agent with the use of - - -" makes no sense as Japanese and it is completely unknown what constitution the "agent" has.

Such being the case, claims 1 to 3 do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ A61K48/00, 38/17, 45/00, A61P35/00, 43/00		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ A61K38/00-38/58, 45/00-45/08, 48/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
BIOSIS (DIALOG) WPI (DIALOG) GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	KAGHAD, Mourad <i>et al.</i> , Monoallelically Expressed Gene Related to p53 at 1p36, a Region Frequently Deleted in Neuroblastoma and Other Human Cancers, Cell, August 22, 1997, Volume 90, Number 4, pages 809-819	7 4-6
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	30.04.03	国際調査報告の発送日
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 内 田 俊 生 電話番号 03-3581-1101 内線 3492

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	POZNIAC, Christine D. <i>et al.</i> , An Anti-Apoptotic Role for the p53 Family Member, p73, During Developmental Neuron Death, Science, July 14, 2000, Volume 289, Number 5477, pages 304-306	7 4-6
A	GOTTLIEB, Tanya M. <i>et al.</i> , p53 and apoptosis, Seminars in Cancer Biology, 1998, Volume 8, pages 359-368	4-7
A	TAKADA, Naoyuki <i>et al.</i> , Identification of a Transactivation Activity in the COOH-Terminal Region of p73 Which Is Impaired in the Naturally Occurring Mutants Found in Human Neuroblastomas, Cancer Research, June 15, 1999, Volume 59, Number 12, pages 2810-2814	4-7

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☒ 請求の範囲 1-3 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

(特別ページ参照)
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

第I欄の2. について

請求の範囲1-3には「……を利用することよりなる……アポトーシス誘導調節剤」と記載されているところ、この「アポトーシス誘導調節剤」は、明細書の記載からみて「アポトーシス誘導を調節する剤」を意味しているものと解されるから、「……を利用することよりなる」は「剤」を修飾していると見るほかない。しかし、「……を利用することよりなる…剤」では、そもそも、日本語としての意味をなさず、「剤」が具体的にどのような構成からなるものであるのかが全く不明である。

したがって、請求の範囲1-3は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない。